

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en Ciencias
Biológicas

“Efecto de metales pesados y plaguicidas sobre organismos planctónicos de diferente nivel trófico y eficiencia de acumulación por microalgas”

Prof. Lic. Luciana María Regaldo

Director de Tesis: Dr. Horacio E. Troiani
Co-Directora de Tesis: Dra. Ana María Gagneten

Lugar de realización:

Laboratorio de Ecotoxicología. Facultad de Humanidades y Ciencias.
Universidad Nacional del Litoral. Ciudad Universitaria Paraje “El Pozo” s/n.
CP 3000. Santa Fe. Argentina.

Centro Atómico Bariloche. Comisión Nacional de Energía Atómica. Avenida
Bustillo Km 9.5. CP 8400. San Carlos de Bariloche. Río Negro. Argentina.

-2013-

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (UNL), sede del Doctorado en Ciencias Biológicas, el apoyo brindado para la realización de esta Tesis. Gracias también por las atenciones prestadas y la buena predisposición para responder ante las consultas realizadas.

Agradezco muy especialmente a la Facultad de Humanidades y Ciencias (FHUC-UNL), no sólo por brindarme el espacio físico, sino también por acompañarme en mi formación de grado y posgrado con el apoyo y la buena predisposición por parte de todos los que trabajan en la gestión de esta gran familia académica. Dicha institución, además, constituyó un ámbito de enriquecimiento intelectual, de adquisición de marcos teóricos y destrezas prácticas, y de consolidación de grupos de trabajo con una invaluable calidad humana.

Agradezco al Centro Atómico Bariloche (CAB- Comisión Nacional de Energía Atómica) por abrirme las puertas para desarrollar parte de las técnicas analíticas implementadas en esta tesis. A Cacho Cottaro por disponer de su tiempo para la obtención de micrografías electrónicas.

Al Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (INTEC I, CONICET-UNL) por brindarme el equipamiento y el apoyo profesional para el desarrollo de técnicas analíticas. Especialmente mi agradecimiento a la Ing. Susana Gervasio, por su humildad, su calidez y sobre todo por su paciencia y entusiasmo a la hora de explicarme el manejo de instrumental y técnicas analíticas que fueron claves en el desarrollo de este trabajo.

A la Facultad de Ingeniería Química (UNL), especialmente a María Rosa Repetti, Silvia Gracia, Florencia Magni y Horacio Beldoménico, por el apoyo recibido en la aplicación de técnicas analíticas para la determinación de plaguicidas.

A la Universidad Nacional del Litoral, quien me acompañó no sólo mediante el financiamiento de mi beca doctoral, sino también con el otorgamiento de los proyectos CAI+D permitiendo acceder a parte del equipamiento, insumos y servicios para la realización de la presente Tesis.

A la Secretaría de Estado de Ciencia, Tecnología e Innovación de la Provincia de Santa Fe que nos ha permitido acceder a los Proyectos Provincia, subsidiando también parte de nuestro trabajo de investigación.

- Los ensayos de toxicidad, de bioacumulación y los análisis cuali-cuantitativo de zooplancton se realizaron en el Laboratorio de Ecotoxicología de la Facultad de Humanidades y Ciencias (UNL). Santa Fe.
- Las micrográficas electrónicas (SEM) y las técnicas de microanálisis (XEDS) se realizaron en el Centro Atómico Bariloche (Provincia de Río Negro) bajo la supervisión del Dr. Horacio Troiani y el Tec. Carlos Cottaro.
- Las determinaciones de Cr, Cu, Pb y As en diferentes matrices, entre ellas: microalgas, efluentes, agua y sedimento se realizaron en el Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (INTEC I CONICET-UNL) (Santa Fe), bajo la supervisión de la Ing. Susana Gervasio.
- Las determinaciones plaguicidas (Atraza y Endosulfán) en diferentes matrices (agua de arroyos y sobrenadante) se realizaron en el Laboratorio de química analítica de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Litoral. Responsables de dichos análisis: Ing. Ma. Rosa Repetti, Ing. Silvia García y el Dr. Horacio Beldoménico (Integrantes del PRINARC: Programa de Investigación y Análisis de Residuos y Contaminantes Químicos).

Debo agradecer de manera especial a mis directores Ana María Gagneten y Horacio Troiani, por su apoyo, paciencia, confianza y capacidad de guiar mi trabajo. Los conocimientos propios enmarcados en su orientación y seguimiento han sido de suma importancia en el trabajo que hemos logrado juntos. Les agradezco también por haberme facilitado los medios necesarios para llevar a cabo los objetivos planteados en la tesis. Horacio gracias por tu buena predisposición y por todo el apoyo recibido en cada viaje que realicé al Centro Atómico. Ana gracias por tu humildad, compromiso, por las críticas, correcciones, por el entusiasmo que me transmitís y por compartir tantos momentos lindos e invaluable que marcaron y seguirán enriqueciendo mi formación intelectual y personal. Atributos que definen tu grandeza como persona.

A mi amigo y compañero de laboratorio Ulises Reno, por compartir su música en las jornadas laborales y por hacer con sus reflexivos y cálidos relatos muy amena mis horas laborales. Gracias por acompañarme.

A mis compañeras y amigos/os de la FHUC y del INALI: Wanda Polla, Viviana Fernandez, Milagros Dalmazzo, Rut Straser, Fernanda Bainotti, Ma. Florencia Gutierrez, Fernando Manibardo, Luciana Montalto, Alba Imhof y demás compañeras/os del Departamento de Ciencias Naturales con las/os que intercambiamos experiencias de vida, gracias por su calidez humana.

A todos aquellos colegas, compañeros y alumnos de la Lic. en Biodiversidad, especialmente a Trilce Castillo, Jérica Tobke, Ornela Bresan, Ignacio Sobrevilla e Ing. Agr. Germán Taparello que de una u otra forma me brindaron su apoyo, compartiendo horas de trabajo e intercambiando experiencias de vida que sin dudas enriquecen y reconfortan.

Agradezco a mi familia, especialmente a mis padres, hermanos y amigos, por estar siempre; por el apoyo incondicional, la confianza, y el amor que me brindan.

Finalmente agradezco a mis hijos *Juan Cruz* y *Lara* que caminan a mi lado siempre y me dan las fuerzas para seguir haciendo más de lo que me gusta.

“¿Y la naturaleza?. En cierto modo, se podría decir, los derechos humanos abarcan a la naturaleza, porque ella no es una tarjeta postal para ser mirada desde afuera; pero bien sabe la naturaleza que hasta las mejores leyes humanas la tratan como objeto de propiedad, y nunca como sujeto de derecho”.

Un objeto que quiere ser sujeto. Eduardo Galeano.

	<i>Índice General</i>
INDICE GENERAL	Página
Agradecimientos	2
Publicaciones y comunicaciones	10
Índice de Tablas	12
Índice de Figuras	14
Abreviaturas y Símbolos	18
1.- RESUMEN	19
2.- SUMMARY	24
3.- INTRODUCCIÓN GENERAL	29
3.1.- Contexto ambiental. La ecotoxicología y sus herramientas de análisis para el control y monitoreo	29
3.2.- OBJETIVOS	35
3.3.- HIPOTESIS	36
CAPITULO I	37
4.- MATERIALES Y METODOS	38
4.1.- Contexto ambiental	38
4.1.1.- Área de estudio	38
4.1.2.- Sitios de muestreo	40
4.1.3.- Determinación de parámetros ambientales	44
4.1.3.1.- Toma y procesamiento de las muestras	45
4.1.3.2.- Análisis químicos y fisicoquímicos en agua y sedimentos	45
4.1.3.3.- Instrumental empleado para análisis de metales pesados y arsénico	47
4.1.3.4.- Análisis numérico y estadístico de datos químicos y fisicoquímicos en agua y sedimentos	48
4.2.- Toma y procesamiento de las muestras de zooplancton	48
4.2.1.- Puesta a punto de la metodología de muestreo	48
4.2.2.- Muestreo de zooplancton y análisis taxonómico	48
5.- RESULTADOS	50
5.1.- Contexto ambiental	50

5.1.1.- Características del agua y sedimento	50
5.1.1.1.- Parámetros físicos y químicos del agua	50
5.1.1.2.- Metales pesados y arsénico en agua	57
5.1.1.3.- Metales pesados y arsénico en sedimentos	59
5.1.1.4.- Plaguicidas en agua	61
5.2.- Estructura del zooplancton	63
5.2.1.- Riqueza de especies	63
6.- DISCUSIÓN PARCIAL	72
CAPITULO II	85
4.- MATERIALES Y METODOS	86
4.1.- Efectos de metales pesados sobre atributos de historia de vida de <i>Daphnia magna</i> y cladóceros representativos del Litoral Fluvial Argentino (LFA)	86
4.1.1.- Recolección y selección de las especies test	86
4.1.2.- Mantenimiento de cultivos stock	88
4.1.3.- Preparación de soluciones stock	89
4.1.4.- Ensayos de toxicidad	89
4.1.4.1.- Test agudos	89
4.1.4.2.- Test crónicos	90
4.2.- Aplicación de técnicas de microscopía electrónica de barrido (SEM) y microanálisis XEDS (X rays energy dispersive spectrometry) en estudios ecotoxicológicos	91
4.2.1.- SEM y XEDS. <i>Daphnia magna</i>	93
4.2.2.- SEM y XEDS. <i>Chlorella vulgaris</i>	94
5.- RESULTADOS	95
5.1.- Ensayos Agudos	95
5.2.- Ensayos Crónicos: Atributos de historia de vida	95
5.3.- Determinación de posibles zonas de depósito de metales pesados mediante el uso de micrografías electrónicas (SEM) y la técnica de microanálisis XEDS	99
5.3.1.- <i>Daphnia magna</i> . SEM y XEDS	99
5.3.2.- <i>Chlorella vulgaris</i> . Estudio comparativo con SEM	103

5.3.3.- <i>Daphnia magna</i> . Una aproximación a sus microestructuras con SEM	113
6.- DISCUSIÓN PARCIAL	116
6.1.- Efectos Agudos	116
6.2.- Efectos sobre atributos de historia de vida	119
6.3.- Aplicación de microscopía electrónica de barrido y microanálisis XEDS	122
CAPITULO III	126
4.- MATERIALES Y METODOS	127
4.1.- Condiciones de cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i>	127
4.2.- Ensayos de remoción de metales pesados	127
4.2.1.- Eficiencia de remoción de metales pesados de soluciones enriquecidas con Cu y Pb.	127
4.2.2.- Eficiencia de remoción de Cr de efluentes industriales	128
4.2.3.- Determinación de las concentraciones de Cu, Pb y Cr en el sobrenadante (soluciones acuosas) y en las microalgas (pellet) e instrumental empleado	130
4.3.- Ensayos de remoción de plaguicidas	130
4.3.1.- Eficiencia de remoción de Plaguicidas de soluciones enriquecidas con Atrazina (Atr) y Endosulfán (End).	130
4.3.2.- Determinación de las concentraciones de plaguicidas en el sobrenadante	131
4.4.- Efectos de metales pesados y plaguicidas sobre el crecimiento de <i>C. vulgaris</i>	131
4.4.1.- Inhibición del crecimiento algal con metales pesados	131
4.4.2.- Inhibición del crecimiento algal con plaguicidas	131
4.5.- Análisis numérico y estadístico de datos	132
5.- RESULTADOS	133
5.1.- Ensayos de remoción de metales pesados	133
5.1.1.- Eficiencia de remoción de metales pesados de soluciones enriquecidas con Cu y Pb	133
5.1.2.- Eficiencia de remoción de cromo de efluentes industriales	135
5.2.- Ensayos de remoción de plaguicidas	136
5.2.1.- Eficiencia de remoción de Plaguicidas de soluciones enriquecidas con Atr	136

y End	
5.3.- Efectos de metales pesados y plaguicidas sobre el crecimiento de <i>C. vulgaris</i>	137
5.3.1.- Concentraciones Efectivas 50	137
5.3.2.- Efectos de metales pesados (Cu, Cr y Pb) sobre la tasa de crecimiento de <i>C. vulgaris</i>	138
5.3.3.- Efectos de Plaguicidas (Gly, End y Atr) sobre la tasa de crecimiento de <i>C. vulgaris</i>	140
6.- DISCUSIÓN PARCIAL	142
6.1.- Ensayos con Cu. Test de inhibición del crecimiento y eficiencia de remoción de <i>C. vulgaris</i> .	142
6.2.- Ensayos con Pb. Test de inhibición del crecimiento y eficiencia de remoción de <i>C. vulgaris</i>	143
6.3.- Ensayos con Cr. Test de inhibición del crecimiento y eficiencia de remoción de <i>C. vulgaris</i>	145
6.4.- Ensayos con Atr. Test de inhibición del crecimiento y eficiencia de remoción de <i>C. vulgaris</i>	147
6.5.- Ensayos con End. Test de inhibición del crecimiento y eficiencia de remoción de <i>C. vulgaris</i>	148
6.6.- Ensayos con Gly. Test de inhibición del crecimiento algal	149
7.- CONCLUSIONES GENERALES	151
7.1.- Contexto ambiental. La ecotoxicología y sus herramientas de análisis para el control y monitoreo	151
7.2.- Ensayos de toxicidad en laboratorio. Aplicación de técnicas de microcopia electrónica y microanálisis	153
7.3.- Empleo de microalgas en aplicaciones biotecnológicas de remediación y efecto de xenobióticos sobre su crecimiento	155
8.- REFERENCIAS	158

A continuación se detallan los trabajos publicados y las presentaciones en reuniones científicas que fueron producto del trabajo realizado en esta Tesis:

1.- Publicaciones

- [1] **Regaldo, L.**; Gervasio S.; Gagneten, A.M. y Troiani, H. (2013). *Bioaccumulation and Toxicity of Copper and Lead in Chlorella vulgaris*. J. Algal Biomass Utiln. 4 (2): 59-66. (F.I. = 1). ISSN: 2229- 6905.
- [2] **Regaldo, L.**; Reno, U; Gervasio, S; Troiani, H. y Gagneten, A.M. (2014). *Metals effects on Daphnia magna and cladocerans representatives of the Argentinean Fluvial Littoral*. J. of Environm. Biol. Vol. 35. (F.I. = 0,68). ISSN: 0254-8704.

Capítulos de libro:

- [3] Gagneten, A.M.; **Regaldo, L.** y Troiani, H. (2009). *Uso del SEM para determinar efectos tóxicos del cromo en la estructura morfológica de Chlorella sp. y Daphnia magna*. En: *SETAC LA. Química y Toxicología Ambiental en América Latina* (Eds.: Jorge Herkovits) Sociedad de Toxicología y Química Ambiental (SETAC). Buenos Aires, p. 130-132. ISBN: 978-987-25370-0-5.

2.- Presentaciones en reuniones científicas

2.1.- Nacionales:

- [1] **Regaldo, L.**; Gervasio, S.; Reno, U.; Troiani, H. y Gagneten, A.M. (2012). *Eficiencia de Chlorella vulgaris para disminuir la concentración de cromo de efluentes industriales*. VI Congreso Argentino de la sociedad de Toxicología y química ambiental. SETAC. Armonizando esfuerzos científicos y política ambiental. Buenos Aires.
- [2] Castillo, T.; **Regaldo, L.** y Gagneten, A.M. (2011). *Análisis comparativo de normativas nacionales, provinciales y locales relacionadas con el control fitosanitario*. 76 Reunión de Comunicaciones Científicas de la Asociación de Ciencias Naturales del Litoral. Santa Fe.
- [3] **Regaldo, L.**; Gagneten, A.M. y Troiani, H. (2008). *Parámetros poblacionales y atributos de historia de vida de Daphnia magna Straus como indicadores de estrés ambiental por metales pesados*. II Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental (SETAC). Avances en Toxicología y Química Ambiental. Mar del Plata.
- [4] **Regaldo, L.**; Gagneten, A.M; Troiani, H. y Cotaro, C. (2008). *Una aproximación a la microestructura de Daphnia magna Straus*. 74° Reunión de Comunicaciones Científicas, Asociación de Ciencias Naturales del Litoral (ACNL). Santa Fe.

2.2.- Internacionales:

- [5] Repetti, M.R.; **Regaldo, L.**; Murialdo, R.; Magni, F.; Ruiz Moreno D.; García, S.R. y Beldoménico, H. (2013). *Determination of atrazine in environmental samples (soil and water) by UHPLC-MS/MS*. 4th Latin American Pesticide Residue Workshop. Bogotá, Colombia.
- [6] **Regaldo, L.**; Gagnetten, A.M.; Gervasio, S.; Reno, U. y Troiani, H. (2012). *Biosorption of Pb by Chlorella vulgaris (Chlorophyceae) at laboratory scale*. SETAC world Congress, Berlín, Alemania.
- [7] **Regaldo, L.**; Gagnetten, A.M.; Gervasio, S. y Troiani, H. (2012). *Eficiencia de remoción de Cobre por Chlorella vulgaris a escala de laboratorio*. Congreso Latinoamericano de Biotecnología Algal (CLABA). Concepción, Chile.
- [8] **Regaldo, L.**; Gagnetten, A.M.; Reno, U. y Troiani, H. (2012). *Efecto inhibitorio de metales pesados sobre el crecimiento poblacional de Chlorella vulgaris (Chlorophyceae)*. Congreso Latinoamericano de Biotecnología Algal (CLABA). Concepción, Chile.
- [9] **Regaldo, L.**; Gagnetten, A.M.; Reno, U. y Troiani, H. (2012). *Estudio comparativo del efecto inhibitorio del glifosato, endosulfán y atrazina sobre el crecimiento de Chlorella vulgaris*. Congreso Latinoamericano de Biotecnología Algal (CLABA). Concepción, Chile.
- [10] **Regaldo, L.**; Gagnetten, A.M. y Troiani, H. (2011). *Relevancia de atributos de historia de vida de Cladóceros para el biomonitorio de metales pesados*. X Congreso de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental Latinoamericana (SETAC-LA). Cumaná, Venezuela.

3. Distinciones:

Premiada por la International Society for Applied Phycology por el trabajo titulado: ***Eficiencia de remoción de cobre por Chlorella vulgaris a escala de laboratorio***. III Congreso Latinoamericano de Biotecnología Algal (CLABA). 16-18/01/12. Concepción, Chile.

CAPITULO I

Tabla 1: Riqueza de especies por grupo taxonómico (Rotífera, Cladocera y Copepoda) registrados en los cuatro sitios de muestreo durante un año (agosto de 2011-agosto de 2012). 67

Tabla 2: Niveles guía de calidad de agua y sedimento para la protección de la biota acuática (aplicable a agua dulce) propuestos por la Subsecretaría de Recursos Hídricos de la República Argentina (2003 a y b, 2004 a y b y 2005 a y b) y la Canadian Environmental Quality Guidelines (2003). *Si se determina sólo la concentración de Cr total (Cr^{+6} y Cr^{+3}) el nivel guía de aplicación es el derivado para Cr^{+6} . ** Valor de dureza a la que se ajustan los datos: $100 CaCO_3 (mgL^{-1})$. *** $1 \mu gL^{-1}$ para Cr^{+6} y $8.9 \mu gL^{-1}$ para Cr^{+3} . 74

Tabla 3: Relación entre las concentraciones de plaguicidas, metales pesados y Arsénico en agua y sedimento y riqueza de taxa registrados en cada uno de los cuatro sitios estudiados. (Promedios de 12 muestras por sitio). Los signos > indican los grados de concentración y riqueza de especies decreciente de izquierda a derecha. 76

Tabla 4: Los valores indican el número de veces que se superan los niveles guía. Calculados a partir de relacionar las concentraciones de metales y plaguicidas registrados en agua y sedimento con los niveles guía de calidad de agua ambiente para la protección de la biota acuática (aplicable a agua dulce) propuestos por la Subsecretaría de Recursos Hídricos de la República Argentina (2003 a y b, 2004 a y b y 2005 a y b) y la Canadian Environmental Quality Guidelines (2003) (empleada en este caso sólo para sedimento). NS: no supera los niveles guías establecidos. 83

CAPITULO II

Tabla 5: Concentraciones efectivas para el 50 % de la población (CE_{50}, mgL^{-1}) obtenida a las 24 y 48 h de exposición a Cu, Cr y Pb para las tres especies de cladóceros (seis concentraciones y control. Tres réplicas por tratamiento). Se muestran los límites de confianza superior e inferior ($\alpha = 0,05$) entre paréntesis. 95

Tabla 6: Valores de oxígeno disuelto (OD, mgL^{-1}) y pH obtenidos al finalizar los ensayos agudos (48 h). Promedios y desvíos de seis concentraciones (tres réplicas por concentración). Se muestran los desvíos estándar en entre paréntesis. 95

Tabla 7: Resultados de Análisis de la varianza (ANOVA) con post test de Tukey-Kramer para sobrevivencia, fecundidad y número de mudas de *D. magna*, *C. dubia* y *M. macleayi* luego de ser expuesta a Cu, Cr y Pb por un período de 15 días. ns: No significativo; (*) Diferencias significativas ($p < 0.05$); (**) Diferencias altamente significativas ($p < 0.01$); (***) Diferencias extremadamente significativas ($p < 0.001$) ($n=10$). 96

Tabla 8: Edad de la primera reproducción (días) de *D. magna*, *M. macleayi* y *C. dubia* luego de ser expuestas a tres concentraciones de Cu, Cr, Pb y el control durante 15 días. (n: número de hembras que alcanzaron la madurez sexual). (*) Diferencias significativas con respecto al control ($p < 0.05$); (**) Diferencias altamente significativas ($p < 0.01$); (***) Diferencias extremadamente significativas ($p < 0.001$) ($n=10$) -: sin reproducción. 96

Tabla 9: Composición química obtenida mediante XEDS barriendo una superficie correspondiente al exoesqueleto de *D. magna* expuesta a $150 \mu gL^{-1}$ de Cr durante 24 h: Cr T1 24 y Cr T1 24-b (Wt%: porcentaje de peso atómico). 101

Tabla 10: Composición química obtenida mediante XEDS barriendo la superficie con SEM correspondiente al epipio de *D. magna* expuesta a $150 \mu gL^{-1}$ de Cr durante 48 h (Cr Ef T1-a: zona donde se encuentra el embrión y Cr Ef T1-b: cubierta adyacente al embrión (Wt%: porcentaje de peso atómico). 102

Tabla 11: Composición química obtenida mediante XEDS barriendo la superficie con SEM correspondiente al epipio de *D. magna* expuesta a 280 µgL⁻¹ de Cr durante 48 h (Cr Ef T2-a: zona donde se encuentra el embrión - Wt%: porcentaje de peso atómico). 103

CAPITULO III

Tabla 12: Parámetros fisicoquímicos del efluente que ingresa a la planta de tratamiento del Consorcio para la preservación de la ecología S.A. Esperanza. Santa Fe. (Mayol y Hammerly, 2012) 128

Tabla 13: Concentraciones de Cu y Pb (mgL⁻¹) en el sobrenadante luego de ser expuesta *C. vulgaris* durante 10 min, 30 min, 1 h, 12 h, y 24 h. (±) Desvío estándar (tres réplicas por tratamiento). Los asteriscos señalan diferencias significativas entre la concentración inicial y la registrada en los demás tiempos de exposición, testeados con ANOVA, MR y post test de Dunnett. (*) Diferencias significativas ($p < 0.05$); (**) Diferencias altamente significativas ($p < 0.01$). 134

Tabla 14: Concentraciones de Atr y End (µgL⁻¹) en el sobrenadante luego de la exposición a la acción de *C. vulgaris* durante 24 h. (±) Desvío estándar (tres réplicas por tratamiento). Los asteriscos denotan diferencias significativas entre las concentraciones iniciales y finales de Atr y End, testeados con test t pareado. (*) Diferencias significativas ($p < 0.05$); (**) Diferencias altamente significativas ($p < 0.01$); (***) Diferencias extremadamente significativas ($p < 0.001$). 137

Tabla Nº 15: Concentraciones efectivas para el 50 % de la población de *C. vulgaris* (CE₅₀, mgL⁻¹) obtenida a las 24, 48 y 72 h de exposición a metales pesados (Cu, Cr y Pb) y plaguicidas (Gly, End y Atr). Seis concentraciones y el control. Tres réplicas por tratamiento. 138

Índice de Figuras	Página
CAPITULO I	
Figura Nº 1: Cuencas Hidrográficas de la República Argentina. El color verde claro señala el área que ocupa el sistema del Río Paraná, mientras que el verde oscuro indica el área que abarca la Cuenca Colastiné – Corralito. Fuente: Atlas Digital de los recursos Hídricos superficiales de la República Argentina. Versión 2002.	39
Figura Nº 2: Cuencas superficiales y regiones hídricas de la provincia de Santa Fe (escala: 1:250.000). El nro. 30 señala el área que ocupa la cuenca del Aº Colastiné –Corralito en la provincia de Santa Fe. Fuente: Atlas digital de Cuencas y Regiones Hídricas Superficiales de la República Argentina. Versión 2010.	39
Figura Nº 3: Cuenca del Aº Colastiné. S1, S2, S3 y S4 señalan los sitios de muestreo. Fuente: Cartografía hídrica superficial digital de la provincia de Santa Fe. Atlas digital de Cuencas y Regiones Hídricas Superficiales de la República Argentina. Versión 2010.	41
Figura Nº 4: Sitio uno.- Canal Santa María - Aº Colastiné: punto cercano a la localidad Coronel Rodríguez, provincia de Santa Fe (Argentina).	42
Figura Nº 5: Sitio dos.- Aº Corralito: ubicado entre la localidad de López y Santa Clara de la Buena Vista, provincia de Santa Fe (Argentina).	42
Figura Nº 6: Sitio tres.- Aº Colastiné: tramo posterior a la confluencia del canal Santa María y el Aº Corralito. Entre la localidad de Gessler y Loma Alta. Santa Fe (Argentina).	43
Figura Nº 7: Sitio cuatro.- Aº Colastiné: cercano a la desembocadura en el Río Coronda. Entre la Localidad de Coronda y Arocena. Santa Fe (Argentina).	43
Figura Nº 8: Parámetros físicos y químicos registrados en agua. Los valores de temperatura, profundidad, transparencia, pH, conductividad, velocidad de la corriente, sólidos totales suspendidos y oxígeno disuelto corresponden al promedio anual registrado en cada sitio de muestreo (S1, S2, S3 y S4) (rombos azules) con sus correspondientes desvíos estándar (barras).	51
Figura Nº 9: Las barras amarillas indican los registros de conductividad ($\mu\text{S cm}^{-1}$) mensual, mientras que la línea azul muestra las variaciones de precipitaciones (promedios mensuales, mm) observados en S1, S2, S3 y S4.	53
Figura Nº 10: Imagen de suelo del Sitio dos tomada en Septiembre de 2011, caracterizado por presentar arcilla sódica. La capa superficial es ácida, poco agregada, sólo en presencia de un alto contenido sódico se forman bloques. El agua freática cargada de sales afecta el perfil, mostrando variación en su porcentaje salino. Manzi y Gallardo (1970).	54
Figura Nº 11: Parámetros químicos registrados mensualmente en cada sitios de muestreo (S1, S2, S3 y S4): demanda química de oxígeno (DQO), demanda biológica de oxígeno (DBO), carbono orgánico total (TOC), nitratos (NO_3^-); nitritos (NO_2^-), fosforo reactivo soluble (PRS) y clorofila <i>a</i> . *Meses donde no se realizaron análisis de estos parámetros.	56
Figura Nº 12: Concentraciones de Cr, Cu, Pb y As ($\mu\text{g L}^{-1}$) en agua. Los valores corresponden al promedio de 12 muestras por cada sitio (S1, S2, S3 y S4).	57
Figura Nº 13: Concentraciones de Cr, Cu, Pb y As ($\mu\text{g L}^{-1}$) en agua en los cuatro sitios (S1, S2, S3 y S4) correspondientes a los 12 meses de muestreo.	59
Figura Nº 14: Concentraciones de Cr, Cu, Pb y As ($\mu\text{g g}^{-1}$) en sedimento. Los valores corresponden al promedio de 12 muestras por cada sitio (S1, S2, S3 y S4).	60

Figura Nº 15: Concentraciones de Cr, Cu, Pb y As (μgg^{-1}) en sedimento en los cuatro sitios (S1, S2, S3 y S4) correspondientes a los 12 meses de muestreo.	61
Figura Nº 16: Concentraciones de Atr y End total (αEND , βEND y END. SULFATO) (μgL^{-1}) en agua. Los valores corresponden al promedio de 12 muestras por cada sitio (S1, S2, S3 y S4).	62
Figura Nº 17: Concentraciones Atr y End total (μgL^{-1}) (αEND , βEND y END. SULFATO) en agua en cuatro sitios (S1, S2, S3 y S4) correspondientes a los 12 meses de muestreo.	63
Figura Nº 18: Riqueza de especies de rotíferos y cladóceros en cada sitio estudiado (S1, S2, S3 y S4) durante un año de muestreo.	68
Figura Nº 19: Riqueza de especies de cladóceros y rotíferos registradas en cada sitio (S1, S2, S3 y S4) durante los 12 meses de muestreo.	70
Figura Nº 20: Frecuencia de aparición de copépodos Cyclopoideos, Harpacticoideos, Calanoideos, copepoditos y nauplios (Nº de registros durante un año de muestreo) mostrado por cada uno de los sitios estudiados (S1, S2, S3 y S4).	70
Figura Nº 21: Frecuencia de aparición de copépodos Cyclopoideos, Harpacticoideos, Calanoideos, copepoditos y nauplios registrados en cada uno de los meses estudiados.	71
CAPITULO II	
Figura Nº 22: Especies seleccionadas para el desarrollo de la presente tesis: a: <i>M. macleayi</i> extraídas de Paggi, (2004); b: <i>M. macleayi</i> : 3A. Vista lateral; 3B Antena; 3C Vista lateral del postabdómen. Extraída de Carruyo-Noguera y col., (2004), tomado de Paggi (1973). c: <i>Ceriodaphnia</i> sp. (Tomada de Dodson y Frey, 1991). d: <i>D. magna</i> .	88
Figura Nº 23: Microscopio Electrónico de Barrido, marca Philips, modelo SEM 515. Centro atómico Bariloche, Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA).	92
Figura Nº 24: Preparación de muestras para SEM. a- Porta muestras de aluminio con adhesivos de carbón donde se coloca la muestra. b- Equipo metalizador Balzers SCD 050.	93
Figura Nº 25: Supervivencia (%) de <i>D. magna</i> , <i>M. macleayi</i> y <i>C. dubia</i> luego de ser expuestas a tres concentraciones de Cu, Cr, Pb y el control durante 15 días (10 réplicas por tratamiento).	97
Figura Nº 26: Fecundidad (Nº de Neonatos) de <i>D. magna</i> , <i>M. macleayi</i> y <i>C. dubia</i> luego de ser expuestas a tres concentraciones de Cu, Cr, Pb y el control durante 15 días. Las barras de error indican 1 D.E. (10 réplicas por tratamiento).	98
Figura Nº 27: Nº de mudas de <i>D. magna</i> , <i>M. macleayi</i> y <i>C. dubia</i> luego de ser expuestas a tres concentraciones de Cu, Cr, Pb y el control durante 15 días. Las barras de error indican 1 D.E. (10 réplicas por tratamiento)	99
Figura Nº 28: Micrografía de <i>D. magna</i> expuesta a $150\ \mu\text{gL}^{-1}$ de Cr durante 24 h. Las zonas correspondientes a Cr T1 24 y Cr T1 24-b indican las regiones del exoesqueleto donde se efectuó microanálisis con XEDS.	100
Figura Nº 29: Espectros de energías obtenido mediante XEDS barriendo una superficie con SEM correspondiente al exoesqueleto de <i>D. magna</i> expuesta a $150\ \mu\text{gL}^{-1}$ de Cr durante 24 h, (Cr T1 24 y Cr T1 24-b).	100
Figura Nº 30: Micrografía de efipio de <i>D. magna</i> expuesta a $150\ \mu\text{gL}^{-1}$ de Cr durante 48 h. Las zonas correspondientes a Cr Ef T1-a y Cr Ef T1-b indican las regiones donde se efectuó microanálisis con XEDS. (Cr Ef T1-a: zona donde se encuentra el embrión y Cr Ef	101

T1-b: cubierta adyacente al embrión).

Figura N° 31: Espectros de energías obtenido mediante XEDS barriendo una superficie con SEM correspondiente al efipio de *D. magna* expuesta a $150 \mu\text{gL}^{-1}$ de Cr durante 48 h (Cr Ef T1-a: zona donde se encuentra el embrión y Cr Ef T1-b: cubierta adyacente al embrión). 101

Figura N° 32: Micrografía de efipio de *D. magna* expuesta a $280 \mu\text{gL}^{-1}$ de Cr durante 48 h. La zona correspondiente a Cr Ef T2-a indica la región donde se efectuó microanálisis con XEDS (Cr Ef T2-a: zona donde se encuentra el embrión). 102

Figura N° 33: Espectros de energía obtenido mediante XEDS barriendo una superficie con SEM correspondiente al efipio de *D. magna* expuesta a $280 \mu\text{gL}^{-1}$ de Cr durante 48 h (Cr Ef T2-a: zona donde se encuentra el embrión). 103

Figura N° 34: Micrografías obtenidas con SEM de células de *C. vulgaris* correspondientes a los controles a distintas escalas: A: $2 \mu\text{m}$, B: $5 \mu\text{m}$, C: $20 \mu\text{m}$ y D: $1 \mu\text{m}$. 104

Figura N° 35: Micrografías obtenidas con SEM de células de *C. vulgaris* expuestas a $150 \mu\text{gL}^{-1}$ (A y B) y $280 \mu\text{gL}^{-1}$ (C y D) de Cr durante 24 y 48 h. 105

Figura N° 36: Micrografías obtenidas con SEM de células de *C. vulgaris* expuestas a $350 \mu\text{gL}^{-1}$ de Cr durante 24 h (A y B) y 48 h (C, D y E). 106

Figura N° 37: Micrografías obtenidas con SEM de células de *C. vulgaris* expuestas a $150 \mu\text{gL}^{-1}$ de Cu durante 24 h (A y B) y 48 h (C, D y E). 107

Figura N° 38: Micrografías obtenidas con SEM de células de *C. vulgaris* expuestas a $280 \mu\text{gL}^{-1}$ de Cu durante 24 h (A y B) y 48 h (C y D). 108

Figura N° 39: Micrografías obtenidas con SEM de células de *C. vulgaris* expuestas a $350 \mu\text{gL}^{-1}$ de Cu durante 24 h (A y B) y 48 h (C, D y E). 109

Figura N° 40: Micrografías obtenidas con SEM de células de *C. vulgaris* expuestas a $150 \mu\text{gL}^{-1}$ de Pb durante 24 h (A y B) y 48 h (C y D). 110

Figura N° 41: Micrografías obtenidas con SEM de células de *C. vulgaris* expuestas a $280 \mu\text{gL}^{-1}$ de Pb durante 24 h (A y B) y 48 h (C y D). 111

Figura N° 42: Micrografías obtenidas con SEM de células de *C. vulgaris* expuestas a $350 \mu\text{gL}^{-1}$ de Pb durante 24 h (A y B) y 48 h (B y C). 112

Figura N° 43: En la fotografía se observan visibles diferencias entre el control (a) y las algas expuestas a Cr (b), Cu (c) y Pb (d). Se puede apreciar la formación de flóculos de *C. vulgaris* al estar en contacto con las diferentes concentraciones de Pb. 112

Figura N° 44: Micrografías obtenidas con SEM de *Daphnia magna*: Ejemplar adulto de *D. magna* (1). Exoesqueleto (2). Detalle del borde anterior de las valvas (3). Detalle de la espina caudal (4, 5, 6). Antena 2 sobre efipio (7). Detalle de antena 2 (8). Antena 2 y apéndice torácico (9). Detalle de apéndice torácico con sedas filtradoras (10). Efipio (11). Detalles de la superficie del efipio: región adyacente al embrión (A) y cubierta que rodea al embrión (B) (12, 13, 14 y 15). 115

CAPITULO III

Figura N° 45: Planta de tratamientos de efluentes. Consorcio para la preservación de la ecología S.A. Esperanza. Santa Fe. 129

Figura N° 46: Reactor Biológico de la planta de tratamientos de efluentes. Consorcio para la preservación de la ecología S.A. Esperanza. Santa Fe. 129

- Figura N° 47:** Cu y Pb (%) removido por *C. vulgaris* a los 10 min, 30 min, 1 h, 12 h y 24 h de exposición a tres concentraciones reales de Cu: 0.45 [C1], 1.30 [C2] y 1.65 [C3] mgL⁻¹ y Pb: 1.951 [C1], 2.826 [C2] y 4.83 [C3] mgL⁻¹. Tres réplicas por tratamiento. Las barras de error indican el desvío estándar. 134
- Figura N° 48:** Cr (%) removido por *C. vulgaris* a las 12 h, 24 h y 48 h de exposición a tres diluciones de efluentes. Cr: 4.870 [D1], 3.158 [D2] y 0.424 [D3] mgL⁻¹. Promedios de tres réplicas por tratamiento. Las barras de error indican el desvío estándar. 135
- Figura N° 49:** Concentraciones iniciales de Cr (mgL⁻¹) en D1, D2 y D3 (Círculos verdes), y en el sobrenadante luego de la exposición a la acción de *C. vulgaris* durante 12 h (Círculos lilas), 24 h (Círculos celestes) y 48 h (Círculos rojos). Las flechas rojas indican el recorrido del efluente. (±) Desvío estándar (tres réplicas por tratamiento). Los asteriscos señalan diferencias significativas entre la concentración inicial y la registrada en los demás tiempos de exposición, testeados con ANOVA, MR y post test de Dunnett. (*) Diferencias significativas ($p < 0.05$); (**) Diferencias altamente significativas ($p < 0.01$). 136
- Figura N° 50:** Atr y End (%) removido por *C. vulgaris* a las 24 h de exposición a dos concentraciones reales de Atr: 43.9 [C1] y 131 [C2] µgL⁻¹, y tres de End: 7.4 [C1], 26 [C2] y 73 [C3] µgL⁻¹. Promedios de tres réplicas por tratamiento. Las barras de error indican el desvío estándar. 137
- Figura N° 51:** Tasa de Crecimiento (µ) de *C. vulgaris* expuesta a seis concentraciones de Cu: 0.02 [C1], 0.05 [C2], 0.10 [C3], 0.20 [C4], 0.40 [C5], 0.80 [C6] mgL⁻¹; Pb: 0.25 [C1], 0.50 [C2], 1.0 [C3], 2.0 [C4], 4.0 [C5], 8.0 [C6] mgL⁻¹; Cr: 0.05 [C1], 0.10 [C2], 0.20 [C3], 0.40 [C4], 0.80 [C5] y 1.60 [C6] mgL⁻¹, y el control (sin metales) por 24 h, 48 h y 72 h. (±) Desvío estándar (tres réplicas por tratamiento). Los asteriscos denotan diferencias significativas entre controles y tratamientos, testeados con ANOVA-MR y post test de Dunnett. (*) Diferencias significativas ($p < 0.05$); (**) Diferencias altamente significativas ($p < 0.01$). 139
- Figura N° 52:** Tasa de Crecimiento (µ) de *C. vulgaris* expuesta a seis concentraciones de Gly: 0.5 [C1], 1 [C2], 2 [C3], 4 [C4], 8 [C5] y 16 [C6] mgL⁻¹; 0.25 [C1], 0.5 [C2], 1 [C3], 2 [C4], 4 [C5] y 8 [C6] mgL⁻¹ de End; 0.01 [C1], 0.02 [C2], 0.04 [C3], 0.08 [C4], 0.16 [C5] y 0.32 [C6] mgL⁻¹ de Atr, y el control (sin plaguicidas) por 24 h, 48 h y 72 h. (±) Desvío estándar (tres réplicas por tratamiento). Los asteriscos denotan diferencias significativas entre controles y tratamientos, testeados con ANOVA-MR y post test de Dunnett. (*) Diferencias significativas ($p < 0.05$); (**) Diferencias altamente significativas ($p < 0.01$) 141

Abreviaturas y Símbolos

μ : Tasa de crecimiento.

ANOVA: Siglas en inglés del análisis de la varianza (“Analysis of Variance”).

ANOVA-MR: Análisis de la viarianza con medidas repetidas.

Aº: Arroyo.

As: Arsénico.

Atr: Atrazina.

C1, C2, C3 y C4: Concentración 1, 2, 3 y 4 respectivamente.

Cd: *Ceriodaphnia dubia*.

CE50: Concentración efectiva para el 50% de la población.

Cr: Cromo.

Cu: Cobre.

D1, D2, D3 y D4: Dilución 1, 2, 3 y 4 respectivamente.

DBO: Demanda Biológica de Oxígeno.

DE: Desvío estándar.

Dm: *Daphnia magna*.

DQO: Demanda Química de Oxígeno.

End: Endosulfán.

Gly: Glifosato.

h: hora.

LFA: Litoral Fluvial Argentino.

Mm: *Moinodaphnia macleayi*.

MP: metales pesados.

NG: Niveles guía.

Pb: Plomo.

RN: Ruta Nacional.

RP: Ruta Provincial.

S1, S2, S3 y S4: Sitio 1, 2, 3 y 4 respectivamente.

SEM: scanning electron microscopy o MEB microscopía electrónica de barrido.

STS: Sólidos totales suspendidos.

TOC: Carbono orgánico total.

XEDS: X rays energy dispersive spectrometry.

1.- RESUMEN

Estudios realizados en el tramo inferior del río Salado y algunos de sus tributarios registraron niveles de Cu, Cr y Pb en agua superiores a los estándares permitidos. Además de la contaminación con metales pesados, con frecuencia los agroquímicos alcanzan al ambiente acuático por escorrentía y/o infiltración, pudiendo afectar a la biota nativa.

Teniendo en cuenta la problemática planteada, en este trabajo se abordó la contaminación por microcontaminantes inorgánicos (Cr, Cu, Pb y As) y plaguicidas (Atrazina -Atr- y endosulfán -End-) en ecosistemas acuáticos continentales sobre organismos planctónicos de diferente nivel trófico -productores y consumidores primarios-, así como la eficiencia de acumulación de dichos contaminantes por microalgas, a escala de laboratorio.

Se realizaron muestreos mensuales durante un año (2011-2012) en cuatro sitios del sistema de los arroyos Colastiné-Corralito, que atraviesan zonas agrícolas e industriales del centro-sur de la provincia de Santa Fe (Argentina) y desembocan en el río Coronda. Se midieron variables fisicoquímicas *in situ* y en laboratorio, además se determinaron las concentraciones de metales pesados y arsénico en agua y sedimento y plaguicidas en agua.

Se analizó la posible vinculación entre la contaminación por metales pesados, arsénico y plaguicidas registrada en agua y sedimento con cambios estructurales de la comunidad zooplanctónica. Las máximas concentraciones de microcontaminantes inorgánicos (Cr, Cu, Pb y As) registradas en agua afectaron negativamente al zooplancton, ya que coincidieron con los valores mínimos observados de riqueza de rotíferos y cladóceros (agosto y septiembre de 2011), pudiendo ser también determinantes de la riqueza de rotíferos, cladóceros y copépodos, algunos valores extremos de conductividad, pH y carga de materia orgánica medidos. En algunos meses del monitoreo efectuado, los valores máximos de Cr y Pb, superaron 137 y 143 veces los niveles guía del Cr, y 87 y 97 veces del Pb. También en el mes de agosto se registró la mayor concentración de Cu en el A⁰ Colastiné, superando 35 veces los valores propuestos para la protección de la biota acuática. En todos los sitios se manifestó el siguiente orden en la concentración de metales y As (arsénico) en sedimento: Pb>Cu>Cr>As.

Contrariamente, la riqueza de cladóceros y rotíferos fue máxima en los meses de febrero y marzo de 2012, que coincidieron con los registros de mínima conductividad, máximas precipitaciones y menores valores de pH. En este período se observaron además los valores máximos de fósforo reactivo soluble y de carbono orgánico total. Todos estos parámetros mostraron diferencias significativas cuando se los comparó con los valores obtenidos en los meses de agosto y septiembre de 2011. A su vez en estos dos meses las concentraciones de plaguicidas en agua no superaron los niveles guía, los metales y el As en agua los superaron levemente y en sedimento sólo el Pb se encontró en niveles superiores a los estándares.

Las concentraciones de metales y As en agua no fueron diferentes entre los cuatro sitios, aunque sí hubo diferencias significativas en la carga de microcontaminantes inorgánicos (Cr, Cu, Pb y As) en el sedimento de cada uno de ellos; además estas concentraciones fueron diferentes entre los meses estudiados. Las concentraciones de Cr en agua siempre fueron superiores a las de Cu, Pb y As. La variación temporal en las concentraciones de metales y As registradas en agua fue mayor en los sitios 1 y 4 que en los sitios 2 y 3.

Las concentraciones de plaguicidas fueron variables en los diferentes meses, fluctuaciones que dependieron posiblemente de la intensidad de las pulverizaciones y de las precipitaciones. La Atrazina en agua estuvo presente en concentraciones mayores que el endosulfán, aunque nunca sobrepasó los niveles guía, mientras que el endosulfán los superó.

Al cuantificar la riqueza de especies por grupo taxonómico (Rotifera, Cladocera y Copepoda) se registró un total de 76 taxa de los cuales el 80.26 % correspondió a rotíferos y el 19.74 % a cladóceros. La riqueza de especies registrada en los diferentes sitios siguió el orden: S4>S3>S2>S1. En el canal Santa María (S1) estuvo representado el 40.98 % del total de las especies de rotíferos, en el A° Corralito (S2) el 59.01 %, y en los dos tramos estudiados del A° Colastiné (S3 y S4) el 67.21 % y 83.6 %. Con respecto a los cladóceros, en S1 estuvo representado el 6.6 %, mientras que en S2, S3 y S4 el 53.33 %, 60 % y 86.6 % respectivamente. Se encontró mayor frecuencia de presencia de copépodos Harpacticoides que de Cyclopoideos y Calanoideos.

Teniendo en cuenta los metales pesados y plaguicidas registrados en campo, nos propusimos analizar a escala de laboratorio, el efecto de los mismos sobre atributos de historia de vida de cladóceros representativos de la fauna Neotropical y del Litoral Fluvial Argentino. Consideramos importante comparar estos resultados con los obtenidos en ensayos con *Daphnia magna*, una especie de distribución holártica, que si bien es utilizada universalmente como organismo prueba, no son representantes de la diversa fauna de cladóceros neotropical. Con tal propósito, se estudió el efecto de Cu, Cr y Pb sobre la sobrevivencia, la fecundidad, la madurez sexual y el crecimiento (estimado por el número de mudas) en *Moinodaphnia macleayi*, *Ceriodaphnia dubia* y *D. magna*, buscando de esta manera impulsar el monitoreo biológico, complemento fundamental al clásico monitoreo físico-químico de sistemas acuáticos contaminados. En ensayos agudos se expusieron a seis concentraciones de Cu, Cr, Pb y los controles, obteniendo la CE₅₀ (24 h y 48 h). En ensayos crónicos (15 días), se expusieron a tres concentraciones de los tres metales con sus respectivos controles. Los puntos finales fueron: sobrevivencia, crecimiento (número de mudas), edad de la primera reproducción y fecundidad (número de crías). Según los resultados obtenidos en ensayos agudos, el orden decreciente de toxicidad fue: Cu > Cr > Pb para las tres especies, que tuvieron el siguiente orden de sensibilidad: *C. dubia* > *D. magna* > *M. macleayi* para Cu y Cr, y *C. dubia* > *M. macleayi* > *D. magna* para Pb. Ensayos crónicos mostraron que el Cu afectó significativamente los atributos

de historia de vida en las tres especies. Concentraciones menores de Pb y Cr, no afectaron la supervivencia, el crecimiento y la fecundidad de *D. magna*, pero retrasaron la madurez sexual. Contrariamente, *M. macleayi* expuesta a Pb alcanzó la madurez sexual en tiempos similares al control, mostrando diferencias extremadamente significativas con el control cuando se comparó su supervivencia, fecundidad y crecimiento en todas las concentraciones. Resultados similares se obtuvieron cuando *C. dubia* fue expuesta a Cr.

Por otra parte, respondiendo a la necesidad de ampliar los conocimientos sobre la aplicación de técnicas de microscopía electrónica de barrido (SEM) y microanálisis XEDS (X rays energy dispersive spectrometry) en estudios ecotoxicológicos, en el presente trabajo se analizaron variaciones en la acumulación y posibles zonas de depósito de Cr, Cu y Pb en *C. vulgaris* y en *D. magna*. Se expusieron a tres concentraciones de los tres metales y se estudiaron diferentes regiones de los ejemplares expuestos y controles (sin exposición a metales), además de realizar mediciones en sus huevos de resistencia o efiptos. En forma complementaria, decidimos realizar una aproximación al estudio de las microestructuras de *D. magna* mediante SEM, ampliando de esta manera conocimientos relacionados con sus características estructurales (antenas, valvas, apéndices, sedas filtradoras y efiptos). Con igual técnica se estudiaron posibles modificaciones morfológicas entre las células de la microalga *C. vulgaris* expuestas a las tres concentraciones de Cr, Cu, Pb y las no expuestas (control).

Los resultados mostraron que en el control, las células de *C. vulgaris* no sufrieron alteraciones manteniendo su forma esférica, pudiendo diferenciarse una zona central de mayor densidad óptica, además no se observaron autosporas libres. Entre los efectos encontrados podemos mencionar: pérdida en diferentes grados de su morfología y del contenido citoplasmático con desorganización de estructuras; pudieron visualizarse restos de paredes celulares, fragmentos celulares y autosporas libres. Si bien se registró la presencia Cr, Cu y Pb no se pudieron determinar zonas de depósito de estos metales, mediante la técnica de microanálisis XEDS. Las concentraciones estuvieron cercanas al límite de detección del equipo, motivo por el cual se concluyó que esta técnica no resulta conveniente para registrar depósitos superficiales de metales, al menos en las concentraciones ensayadas.

En síntesis los metales empleados además de influir negativamente en poblaciones experimentales de cladóceros afectando su ciclo de vida, ocasionan alteraciones morfológicas y lisis celular en su recurso trófico.

Según lo expuesto anteriormente, se destaca no sólo la necesidad de desarrollar conocimientos sobre el impacto que tienen las actividades industriales y agrícolas sobre los ecosistemas regionales a partir del monitoreo ambiental, sino también de avanzar en la investigación de técnicas de remediación. La eficiencia de algunos de los métodos convencionales es diferente para los distintos contaminantes y pueden tener importantes

costos, especialmente cuando deben tratarse grandes volúmenes de agua con bajas concentraciones de metales a ser removidos.

En este marco, se analizó la eficiencia de *C. vulgaris* para remover metales y plaguicidas a escala de laboratorio. Se utilizaron por un lado soluciones enriquecidas con Cu, Pb, Atr y End, y por otro efluentes industriales con diferentes concentraciones de Cr.

Las soluciones experimentales tuvieron tres concentraciones de Cu y tres de Pb (C1, C2 y C3) con sus respectivos controles por triplicado. La eficiencia de remoción fue rápida, decreciendo con el incremento en la concentración de metal y aumentando con el tiempo de exposición. Las microalgas vivas mostraron máxima eficiencia en C1, removiendo 81.97 % de Cu a los 10 min de exposición y a las 12 y 24 h, 92.53 % y 95.07 % respectivamente. En C2 y C3 los porcentajes más altos se obtuvieron más tardíamente: a las 24 h acumularon 73.94 % y 41.43 % respectivamente. En los ensayos con Pb *C. vulgaris* removió 50% y 47% a los 10 min de exposición; 98.7 % y 87% a la hora de exposición en C1 y C2 respectivamente. El máximo porcentaje (72 %) fue obtenido a las 12 y 24 h en C3. Se registraron correlaciones significativas negativas entre la concentración final de Cu y Pb en las algas y en el sobrenadante.

Para realizar los ensayos de bioacumulación de Cr se emplearon tres diluciones de efluentes industriales de curtiembre (D1, D2 y D3) y sus respectivos controles por triplicado. *C. vulgaris* mostró máxima eficiencia en D1 y D2, acumulando el 88.56 % (12 h), 92.12 % (24 h) y 93.81 % (48 h), y 95.08 % (12 h), 96.61 % (24 h) y 98.80 % (48 h) de Cr respectivamente. Contrariamente, los porcentajes más altos de remoción en D3 se obtuvieron a las 48 h, cuando acumularon 52.71 %. En D1 y D2 se registraron correlaciones negativas entre la concentración final de Cr en las algas y en el efluente. No se observaron diferencias significativas en el Cr removido entre los diferentes tiempos de exposición.

Para llevar a cabo los ensayos de remoción de plaguicidas se emplearon dos concentraciones de Atr y tres de End, se evaluó su eficiencia a las 24 h de exposición y se analizaron concentraciones en el sobrenadante. *C. vulgaris* mostró ser más eficiente para remover End que Atr. No se encontraron diferencias significativas entre los porcentajes removidos en C1, C2 y C3, acumulando 95.34 %, 94.93 % y 95.93 % de End respectivamente. Se encontraron diferencias extremadamente significativas entre las concentraciones iniciales y finales. Porcentajes menores de remoción se obtuvieron al exponer a las microalgas a Atr (11,16 % y 51.39 % en C1 y C2 respectivamente), aunque se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones iniciales y finales.

Se concluye que *C. vulgaris* mostró ser eficiente para disminuir concentraciones de metales pesados y plaguicidas desde el orden de ppm al de ppb a partir de soluciones acuosas y de efluentes de curtiembres, por lo que se recomienda en tratamientos de aguas residuales para pruebas a mayor escala.

Además de evaluar la eficiencia de remoción, en el presente trabajo se analizó el efecto inhibitorio de los metales Cu, Cr, Pb y de los plaguicidas, glifosato (Gly), atrazina (Atr) y endosulfán (End) sobre el crecimiento poblacional de *C. vulgaris*. Se emplearon seis concentraciones, con sus respectivos controles por triplicado. La CE_{50} (72 h) para Cr, Cu y Pb fue 0.872, 0.453 y 1.85 mgL^{-1} respectivamente. Las tasas de crecimiento de *C. vulgaris*, correspondientes a los tratamientos con Cr, disminuyeron significativamente con respecto al control cuando fueron expuestas a las tres concentraciones más altas, resultados similares se obtuvieron con Cu. La tasa de crecimiento en los ensayos con Pb mostró un efecto estimulador con respecto al control. También se encontraron diferencias extremadamente significativas cuando se comparó la tasa de crecimiento (μ) en los diferentes tiempos de exposición. La CE_{50} (72 h) para Gly, End y Atr fue 58.59, 1.48 y 1.05 mgL^{-1} respectivamente. Las tasas de crecimiento de *C. vulgaris*, correspondientes a los tratamientos con Gly, mostraron diferencias significativas con respecto al control a las 72 h; con End todas las concentraciones ensayadas mostraron ejercer efectos negativos significativos sobre la tasa de crecimiento a las 72 h; con Atr entre C6 y el control a las 48 h. Por otro lado, se encontraron diferencias extremadamente significativas cuando se comparó μ en los diferentes tiempos de exposición. Se concluye que *C. vulgaris* es sensible a bajas concentraciones de Cu y Cr, Atr y End pudiendo ser utilizada en monitoreo biológico para evaluar esos contaminantes en agua.

A modo de síntesis, el presente trabajo de tesis brinda información relevante sobre las características que determinan la calidad del agua y los sedimentos de arroyos no estudiados hasta el presente en la Provincia de Santa Fe y el efecto de distintos xenobióticos en campo y laboratorio sobre el plancton. Esta información puede ser considerada para rever los niveles guías establecidos a nivel nacional e internacional para la protección de la biota acuática y la posibilidad de considerar a especies representativas del Litoral Fluvial Argentino como organismos test en pruebas de toxicidad. Finalmente, en vistas a la aplicación biotecnológica de *C. vulgaris* como herramienta de remediación ambiental, se propone a esta especie para disminuir concentraciones de Cu, Pb, Cr y End de soluciones acuosas y de efluentes industriales, por lo que se recomienda en tratamientos de aguas residuales aumentando la escala de análisis.

2. - SUMMARY

Studies conducted in the lower Salt River and some of its tributaries recorded higher levels of Cu, Cr and Pb in water than permitted standards. In addition to heavy metal pollution, agrochemicals often reach the aquatic environment through runoff and / or infiltration, affecting the native biota.

In this paper we assess the contamination by heavy metals and pesticides in inland aquatic ecosystems, on planktonic organisms of different trophic-levels: primary-producers and consumers, as well as the efficiency of accumulation of these pollutants by microalgae at a laboratory scale.

Samples were collected monthly for one year at four sites in Santa Fe province (Argentina). Physico-chemical variables were measured *in situ* and in the samples obtained we measured the concentrations of Cr, Cu, Pb and As in water and sediments and pesticides (Atrazine-Atr-and-End-endosulfán) in water.

We analyzed possible links between pollution by heavy metals, arsenic and pesticides in water and sediments, with structural and functional changes of the zooplankton community. The highest concentrations of heavy metals in water affected negatively the zooplankton community, as they coincided with low values of richness of rotifers and cladocerans. Extreme values of conductivity, pH and organic matter could also be determinants of the relative number of rotifers, cladocerans and copepods found.

The maximum values of Cr and Pb, exceeded 137 and 143 times the guideline levels of Cr, and 87 and 97 times the standard for Pb. In August we found the highest concentration of Cu in the Colastiné stream, exceeding 35 times the values proposed for the protection of aquatic biota. Metals in sediments, followed the order: Pb > Cu > Cr > As.

Conversely, the richness of cladocerans and rotifers was highest in the months of February and March 2012, which coincided with low conductivity, maximum rainfall and lower pH values. During this period, we further observed maximum values of soluble reactive phosphorus and total organic carbon. All these parameters showed significant differences when compared with the values obtained in the months of August and September 2011. While on these two months pesticide concentrations in water exceeded guideline levels, the metals in water and sediments slightly exceeded it; only Pb was found at levels above standards.

The metal and arsenic concentrations in water were not different among the four sites, although significant differences were found in metals and arsenic concentrations present in the sediment of each, and these concentrations also shown to be different between the months studied. Cr concentrations in water were always higher to those of Cu, Pb and As, temporal variation in the concentration of metals in water recorded was greater at sites 1 and 4 than at sites 2 and 3.

Pesticide concentrations were variable among different months, fluctuations depending on the intensity of the sprays and precipitations. Atrazine in water was present in higher concentrations than endosulfán, but never exceeded guideline levels, while endosulfán surpassed.

The species richness (Rotifera, Cladocera and Copepoda) was 76 taxa, corresponding 80.26% to rotifers and 19.74% to cladocerans. Species richness recorded at different sites followed the order: S4> S3> S2> S1. In Santa María channel (S1) was represented 40.98% of total rotifer species in the Corralito stream (S2) the 59.01%, and in the two sections studied at Colastiné stream (S3 and S4) were 67.21% and 83.6%. Regarding Cladocerans, in S1 they were represented in 6.6%, while in S2, S3 and S4, in 53.33%, 60% and 86.6% respectively. Harpacticoidea copepods had higher frequency than Cyclopoidea and Calanoidea copepods.

Given the heavy metals and pesticides concentrations registered in the field, we decided to analyze at a laboratory scale, their effects on life history traits of Neotropical cladocerans representatives of the argentinian fluvial littoral fauna. We considered relevant to compare these results with those obtained in tests with *Daphnia magna*, a species of holarctic distribution that, although it is worldwide used as a test organism, it is not representative of the diverse fauna of neotropical cladocerans. We studied the effect of Cu, Cr and Pb on survival, fertility, sexual maturation and growth of *Moinodaphnia macleayi*, *Ceriodaphnia dubia* and *D. magna*, thereby seeking to boost biological monitoring, an essential complement to the classical physical-chemical monitoring of contaminated aquatic systems. In acute assays, they were exposed to 6 concentrations of Cu, Cr, Pb and controls, obtaining CE₅₀ (24 and 48h). In chronic assays (15 days), they were exposed to three concentrations of the metals and controls. Three times a week we recorded: number of living and dead organisms, of molts, age of first reproduction and number of neonates released. These experiences showed the toxicity decreasing order: Cu> Cr> Pb for the three species, which had the following order of sensitivity: *C. dubia*> *D. magna*> *M. macleayi* for Cu and Cr, but *C. dubia*> *M. macleayi*> *D. magna* for Pb. Chronic tests showed that Cu significantly affected life history traits in the three species. Lower concentrations of Pb and Cr did not affect survival, growth and fecundity of *D. magna*, but delayed sexual maturity. Conversely, *M. macleayi* exposed to Pb reached sexual maturity at a similar rate to the control, showing highly significant differences in the survival, the fecundity and in the number of molts in all the concentrations compared to the control. Similar results were obtained when *C. dubia* was exposed to Cr.

In turn, and responding to the need to increase knowledge on the application of scanning electron microscopy (SEM) and microanalysis XEDS (X rays energy dispersive spectrometry) in ecotoxicological studies, in this survey we analyzed changes in the accumulation and potential reservoir zones of Cr, Cu and Pb in *C. vulgaris* and *D. magna*. Both were exposed to three concentrations of the three metals to study various regions of the exposed and control (without

exposure to metals), specimens, as well as on the resistance eggs or ephippia of *D. magna*. Complementing this, we decided to make an approach to the microstructures of *D. magna* using SEM, thus expanding knowledge related to their structural characteristics (antennas, leaflets, appendices, filtering silks and ephippia).

Furthermore, and using the same technique, we studied morphological changes in the cells of the microalga *C. vulgaris* exposed to three concentrations of Cr, Cu, Pb and unexposed ones (control). The results showed that in control cells *C. vulgaris* were unaltered, maintained their spherical shape, and showed a central zone of increased optical density, without free autospores.

By contrast, the metals effects included: loss of the normal morphology, loss of the cytoplasmic content, structural disorganization, broken cell walls, cell fragments and free autospores could be visualized. While we recorded Cr, Cu and Pb, storage areas of these metals could not be determined by the XEDS microanalysis technique. Concentrations used were near the detection limit of the equipment, then we concluded that this technique is not suited to recognize surface metal deposits, at least at the concentrations tested.

In short, the metals here studied negatively affected the experimental populations of cladocerans through changes in their life cycle, and causing cell lysis and morphological alterations in their trophic resource.

As discussed above, we emphasize on the need to develop knowledge about the impact of industrial and agricultural activities on regional ecosystems through environmental monitoring, but also to advance research in remediation techniques. The efficiency of some of the conventional methods are different for different pollutants and may have significant costs, particularly when large volumes of polluted water containing low concentrations of metals to be removed have to be treated.

In this framework, we analyzed the efficiency of *C. vulgaris* to remove metals and pesticides at a laboratory scale. In one side we used solutions with Cu, Pb, Atr and End and in the other side, we tested tannery industrial effluents with different concentrations of Cr. The metal removal was rapid and efficient, decreasing with increasing metal concentration and increasing exposure time. The live microalgae showed maximum efficiency in C1, removing 81.97% Cu at 10 min of exposure and at 12 and 24 h, 92.53% and 95.07% respectively. In C2 and C3 the highest percentages were obtained much later: after 24h accumulated 73.94% and 41.43% respectively. In the experiences with Pb *C. vulgaris* removed 50% and 47% at 10 min of exposure, 98.7% and 87% at the time of exposure to C1 and C2 respectively. The highest percentage (72%) was obtained at 12 and 24 h in C3. Significant correlations were negative between the final concentration of Cu and Pb in the algae and in the supernatant. The Cr bioaccumulation tests were performed using three dilutions of a tannery effluent containing Cr (D1, D2 and D3) and their respective controls in triplicate. *C. vulgaris* showed maximum

efficiency in D1 and D2, accumulating 88.56 (12 h), 92.12 (24 h) and 93.81 % (48 h), and 95.08 (12 h), 96.61 (24 h) and 98.80 % (48 h) of Cr respectively. Conversely, higher percentages of removal in D3 were obtained at 48 h, when the algae accumulated 52.71%. In D1 and D2 we found negative correlations between the final concentration of Cr in algae and in the effluent, but no significant differences in the Cr removed between the different exposure times.

To carry out the tests to assess the potential removal of pesticides we used two concentrations of Atr and three of End; efficiency was evaluated at 24 h of exposure. *C. vulgaris* showed to be more efficient removing End than Atr. No significant differences were found between the percentages removed in C1, C2 and C3, where the algae accumulated 95.34%, 94.93% and 95.93% of End respectively. Extremely significant differences were found between the initial and final concentrations. Smaller percentages of removal were obtained by exposing microalgae to Atr (11.16% and 51.39% in C1 and C2 respectively), although significant differences were found between the initial and the final concentrations.

We conclude that *C. vulgaris* showed to be efficient to reduce concentrations of heavy metals and pesticides from the order of ppm to ppb from aqueous solutions and from tannery effluents, so it is recommended in wastewater treatment on a larger scale.

In addition to evaluating the removal efficiency, in this paper we analyzed the inhibitory effect of the metals Cu, Cr, Pb and pesticides, glyphosate (Gly), atrazine (Atr) and endosulfán (End) on the population growth rate (μ) of *C. vulgaris*. 6 concentrations were used with their respective controls in triplicate. EC_{50} (72 h) to Cr, Cu and Pb was 0.872, 0.453 and 1.851 mgL^{-1} respectively. Growth rates of *C. vulgaris* in the Cr treatments significantly decreased when compared to the control in the three highest concentrations; similar results were obtained with Cu. The growth rate in the Pb experiences showed a stimulatory effect compared with the control.

Extremely significant differences ($p < 0,001$) were found when comparing the growth rate at different exposure times. The EC_{50} (72 h) to Gly, End and Atr was 58.59, 1.48 and 1.05 mgL^{-1} respectively. Growth rates of *C. vulgaris*, corresponding to Gly treatments showed significant differences with the control (72 h), to End all concentrations tested showed significant negative effects on the growth rate at 72 h, with Atr between C6 and control at 48 h. In the Atr assays, between C6 and control (48 h).

Furthermore, extremely significant differences were found when compared μ at different exposure times. We conclude that *C. vulgaris* is sensitive to low concentrations of Cu and Cr, Atr and End and can be used in biological monitoring to assess these metals and pesticides in polluted water.

As a synthesis, this thesis presents relevant information about the main characteristics involved in the quality of water and sediments of streams of the Santa Fe Province not studied at present and about the effects of different xenobiotics tested at laboratory and field scales on

the plankton community. This knowledge can be considered in order to review the established national and international level guides for the protection of the aquatic biota. Moreover, we present the possibility to consider some species representatives of the Argentinian Littoral Fluvial as organisms for toxicity tests. Finally, in order to consider possible biotechnological applications, using *C. vulgaris* as a tool for environmental remediation, we propose this species for diminishing Cu, Pb, Cr and End concentrations from aqueous solutions and industrial effluents, so it is recommended to be used for treatments of wastewaters at higher scales.

Nota: en la presente tesis los contenidos se organizaron de la siguiente manera:

- **INTRODUCCIÓN GENERAL**, donde se abordan las diferentes temáticas que se enmarcan en los objetivos e hipótesis planteadas. Luego se presentan tres capítulos que exponen la metodología empleada, los resultados obtenidos y una discusión parcial:
- **CAPÍTULO I:** Contexto ambiental. La ecotoxicología y sus herramientas de análisis para el control y monitoreo. Desarrollo del trabajo de campo. En este capítulo se aborda el objetivo específico N° 1.
- **CAPÍTULO II:** Ensayos de toxicidad en laboratorio. Aplicación de técnicas de microscopía electrónica y microanálisis. Se desarrollan los objetivos específicos N° 2 y 3.
- **CAPÍTULO III:** Empleo de microalgas en aplicaciones biotecnológicas de remediación y efecto de xenobióticos sobre su crecimiento. En este apartado se abordan los objetivos N° 4 y 5.
- **CONCLUSIONES GENERALES**

“Efecto de metales pesados y plaguicidas sobre organismos planctónicos de diferente nivel trófico y eficiencia de acumulación por microalgas”

3.- INTRODUCCIÓN GENERAL

3.1.- Contexto ambiental. La ecotoxicología y sus herramientas de análisis para el control y monitoreo

Las actividades humanas generan una variedad de desechos que finalmente son liberados al ambiente, ocasionando desequilibrios en los ecosistemas cuando la cantidad y calidad de los mismos superan su capacidad de recuperación. Estas alteraciones, que fueron registradas a distintas escalas espaciales y temporales han llevado a que la “contaminación ambiental” se convierta en una de las problemáticas actuales prioritarias a nivel local, regional e incluso global.

En un intento de revertir esta situación, en las últimas décadas se han ido desarrollando diferentes instrumentos de gestión ambiental cuya finalidad es prevenir, corregir o remediar acciones que perjudiquen el ambiente. Entre ellas podemos mencionar: el empleo de indicadores, el monitoreo ambiental, la implementación de políticas y normas ambientales y el desarrollo de técnicas de remediación.

Los ambientes acuáticos son considerados actualmente sistemas integrados junto con las actividades antrópicas que lo modifican y que dependen del mismo para el sostenimiento de la vida. Éstos son impactados debido a la introducción de contaminantes de diferente origen a través de diversas vías, entre ellas podemos mencionar la recepción de efluentes cloacales e industriales y agua de lavado de zonas expuestas a contaminación, que modifican su composición y en este sentido su calidad para diferentes usos y/o aplicaciones (Lopretto y Tell, 1995).

Como consecuencia, surge la necesidad de elaborar un diagnóstico del estado de los sistemas acuáticos en diferentes áreas, con la finalidad de generar información que permita proponer medidas adecuadas y factibles de manejo para mantenerlos en condiciones óptimas. En este sentido, en nuestro país, y particularmente en la provincia de Santa Fe, se han ido efectuando estudios que informan sobre el estado de dichos ambientes. Citando algunos ejemplos podemos mencionar trabajos realizados en el tramo inferior del río Salado y algunos de sus tributarios (Gallo y col., 2006, Gagneten y Paggi, 2009; José de Paggi y Devercelli, 2011), en donde se registraron, en ciertos casos, niveles de Cu, Cr y Pb en agua superiores a los estándares permitidos, contaminación que podría estar vinculado al vertido de efluentes

provenientes de industrias instaladas en la zona (Gagneten y col., 2007). Sin embargo, es necesario continuar con la realización de trabajos de campo, para brindar información pertinente sobre parámetros físicos, químicos y biológicos de cuencas que aún no han sido estudiadas y son relevantes por los diferentes usos que la sociedad hace de ellas.

Existen múltiples estrategias para abordar esta problemática que, aplicadas de manera integrada, brindan información bastante completa acerca del estado de salud o deterioro ambiental. Entre ellas podemos destacar: la determinación de parámetros fisicoquímicos y bioquímicos, la detección de bioindicadores de contaminación y la realización de ensayos de laboratorio y monitoreo en campo (Lopretto y Tell, 1995). Actualmente resulta evidente que para determinar el impacto de xenobióticos sobre sistemas acuáticos contaminados es necesario recurrir no sólo a la detección y cuantificación de los mismos mediante análisis químicos, sino también es imprescindible estudiar modificaciones de parámetros biológicos utilizando como referencia organismos sensibles a pequeñas dosis de tóxicos.

Estos organismos llamados “Bioindicadores” deben ser abundantes, muy sensibles al estrés ambiental, identificables rápida y fácilmente, y bien estudiados en su ecología y ciclo biológico. En este sentido, diferentes taxa de invertebrados acuáticos pueden presentar respuestas únicas ante estresantes particulares. Dichas respuestas pueden ser consideradas como herramientas para evaluar las condiciones del sistema (Utz y col., 2009). También diferentes componentes de la comunidad zooplanctónica son empleados como indicadores (Gagneten y Paggi, 2009; José de Paggi y Devercelli, 2011, entre otros), reflejando situaciones tempranas de estrés ambiental. Entre ellos, cladóceros como *Daphnia magna* y *Ceriodaphnia dubia* son los más utilizados como organismos de referencia en pruebas de toxicidad. La amplia distribución geográfica, el importante papel que cumplen en la comunidad zooplanctónica, la facilidad de cultivo en el laboratorio, la reproducción partenogenética (lo cual asegura uniformidad de respuesta) y el corto ciclo de vida con la producción de un alto número de crías, han hecho de este grupo un ideal para la evaluación de toxicidad de carácter universal (Díaz Baez y col., 2004). A su vez el zooplancton ocupa un papel clave en los ecosistemas acuáticos, pues al alimentarse de microalgas y materia orgánica particulada y ser el principal alimento de larvas y peces zooplanctófagos (Oliveros, 1980; Escalante, 1982; Rossi 1992 y 2001), participa en la transferencia de materia y energía desde los productores hacia los niveles tróficos superiores.

Para realizar un análisis completo sobre el estado de un sistema acuático, resulta interesante estudiar los efectos de contaminantes sobre diferentes niveles de organización, empleando atributos de historia de vida, parámetros poblacionales y realizando análisis a nivel de toda la comunidad zooplanctónica. Por otro lado, los tests de toxicidad estandarizados nos permiten evaluar efectos directos sobre especies o poblaciones particulares, mientras que los

trabajos realizados en campo, a nivel de comunidad y/o ecosistema, permiten evaluar además efectos indirectos y relaciones causales entre distintos componentes del ecosistema.

Entre los contaminantes de origen antrópico, los metales pesados son considerados los más peligrosos. Numerosos autores han destacado que los iones de éstos pueden entrar a las células a través de los mismos canales de transporte que utilizan cationes fisiológicamente importantes tales como el Ca, Mg, Fe, Cu y Zn (Luoma y Rainbow, 2005), pudiendo competir con ellos por los sitios de adsorción y posterior absorción a la célula (Castañé y col., 2003), provocando deficiencia de estos elementos (Regaldo y col., 2009), alteraciones en actividades enzimáticas, e interrumpiendo procesos metabólicos (Visviki y Rashlin, 1991).

El cobre es un micronutriente esencial, pero se torna tóxico cuando la concentración biodisponible excede un umbral específico. Se lo encuentra como Cu^{+2} en soluciones o formando complejos con ligandos orgánicos e inorgánicos. Los aportes al ambiente acuático provienen generalmente de cañerías de bronce o de cobre que están corroídas, de efluentes de plantas para tratamientos cloacales y del uso como plaguicidas de compuestos con cobre. También puede provenir de industrias mineras, de fundición y de purificación, de las plantas de tratamiento para alambres de cobre, así como de las industrias del hierro y del acero (Srivastava y col., 2006).

El Cr^{+3} tiende a formar complejos estables con moléculas orgánicas y elementos inorgánicos, siendo poco soluble cuando el pH del agua es neutro. Además es considerado menos tóxico que el Cr^{+6} . Éste en cambio es más soluble y reacciona con sustancias orgánicas pudiendo reducirse a Cr^{+3} . Los principales usos de los compuestos de Cr^{+6} incluyen galvanoplastías, la fabricación de pigmentos, inhibidores de la corrosión, síntesis química, curtido del cuero y conservación de la madera (USEPA, 2010).

El plomo y los minerales comunes de plomo son casi insolubles, y en los sistemas acuáticos están asociados a materiales en suspensión. Puede ingresar al ambiente acuático a través del escurrido de calles, de la descarga de aguas residuales industriales y municipales, y de la combustión de gasolina. La minería, el tratamiento y la fundición del plomo, también producen descarga al ambiente acuático, ya sea directamente por medio de efluentes líquidos o mediante aportes atmosféricos (Von Braun y col., 2002).

El arsénico es un metaloide que se encuentra en formas inorgánicas y orgánicas, las más comunes en agua son las especies inorgánicas pentavalentes y trivalentes, cuya prevalencia depende del pH y del potencial de óxido-reducción (Mills y col., 1985; Slooff y col., 1990). Respecto a su toxicidad, se considera que en su estado trivalente es mayor que en el pentavalente y que las formas inorgánicas son más tóxicas que las orgánicas (NRCC, 1978). Su incorporación al agua puede resultar de procesos naturales, entre los que pueden citarse la meteorización de rocas y suelos y la deposición atmosférica de materiales emitidos por la actividad volcánica, así como también de aportes antropogénicos. Entre éstos últimos se

destacan la deposición atmosférica de fracciones emitidas por la actividad industrial, principalmente las provenientes de la fundición y refinación de metales y por diversos efluentes líquidos (Niveles Guía Nacionales de Calidad de Agua Ambiente. Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación Argentina, 2004 a)

Además de la contaminación con metales pesados, con frecuencia los agroquímicos alcanzan al ambiente acuático por escorrentía y/o infiltración, por el lavado de envases, o por la pulverización directa sobre ríos, lagunas o arroyos, pudiendo afectar a la biota nativa (Romero y col., 2011). La República Argentina es el tercer productor mundial de oleaginosas, desde 1990 a 2007 la producción de soja aumentó de 12 a 47 millones de toneladas, mientras que para el período 2012/2013 se prevé una cosecha de 57,82 millones de toneladas (USDA, 2013). El paquete tecnológico que sustenta dicho incremento está vinculado al uso de diferentes plaguicidas, entre ellos el glifosato en mayor medida, la atrazina y el endosulfán en menor medida, mostrando que para un mercado de 260 millones de Kg o litros, los herbicidas implicaron un 60 % del total, seguido por los insecticidas con casi el 20 % (CASAFE, 2011).

Si bien es amplia la bibliografía existente sobre el efecto de los plaguicidas comúnmente empleados a nivel mundial sobre especies representativas del plancton (Hanazato, 2001; Domínguez-Cortinas y col., 2008; Raipulis y col., 2009; Vendrell y col., 2009; Romero y col., 2011, entre otros), existe un gran desconocimiento de la toxicidad de los principios activos y de los coadyudantes agregados en muchos formulados comerciales (Tsiu y Chu, 2003). Éste es el caso del herbicida glifosato (*N*-(fosfometil) glicina), cuyo principal formulado es el Roundup®, de Monsanto Co., que contiene tres componentes básicos: la sal de glifosato con isopropilamina (ingrediente activo), un agente tensioactivo (POEA) y agua (Giesy y col., 2000).

Otro herbicida ampliamente utilizado desde principios de la década de 1960 en Argentina y otros países del mundo (entre ellos: Estados Unidos, Australia, Sudáfrica, Venezuela y la mayoría de los países Europeos) es la atrazina (6-cloro-*N*-etil-*N*-(1-metiletil)-1,3,5-triazina-2,4-diamina). A nivel Nacional, el servicio de Sanidad y Calidad Agroalimentaria permite su uso sin restricciones en cultivos de cereales, plantas forrajeras, caña de azúcar y té, entre otros (SENASA, 1998). La atrazina puede ingresar a los ecosistemas acuáticos principalmente por escurrimiento de aguas pluviales provenientes de áreas cultivadas tratadas. También ha sido registrada en agua de lluvia, resultado de la volatilización originada durante o posterior a las aplicaciones, por la erosión de partículas de suelo que contiene este herbicida adsorbido (Hall y col., 1993). Así, en aguas de escurrimiento adyacentes a campos tratados se han detectado entre 27 y 69 μgL^{-1} , con picos que llegaron hasta 1 mgL^{-1} (De Noyelles y col., 1982). Su persistencia en sistemas acuáticos está influenciada por la naturaleza del material sedimentario, el crecimiento de macrófitas y la actividad microbiana, estando sujeta a la degradación biológica, química y fotoquímica habiéndose reportado para su tiempo de vida valores que varían entre 3 días (Kosinski, 1984) y 8 meses (Dewey, 1986).

Por otra parte, el incremento del área sembrada de soja favoreció el comercio de algunos insecticidas como el endosulfán (6,7,8,9,10,10-hexacloro-1,5,5a,6,9,9a-hexahidro-6,9-metano-2,4,3-benzodioxatíepin-3-óxido), cuyo formulado comercial está compuesto por isómeros alfa y beta en una proporción 70:30 % (USEPA, 1980). Ambos isómeros son considerados tóxicos para la vida acuática y la salud humana (WHO, 1984), pudiendo provocar efectos crónicos por su baja degradación ambiental (Rose y col., 1999) y elevada solubilidad en la fracción lipídica, favoreciendo su acumulación en la biota y su posible biomagnificación (Newman y Unger, 2003).

El endosulfán fue prohibido en varios países durante las últimas décadas (Orozco Barrenetxea y col., 2005). Acompañando los antecedentes internacionales existentes al respecto, en Argentina a partir de la Resolución N° 511 aprobada en el año 2011, se llegó a la prohibición total del uso, importación y elaboración del principio activo y sus formulados.

Como resulta evidente, el empleo de plaguicidas en la producción de alimentos tiene importantes beneficios económicos, pero su aplicación inapropiada implica riesgos para la salud de los pobladores y la sustentabilidad de los ecosistemas regionales.

Según lo expuesto anteriormente, se destaca no sólo la necesidad de desarrollar conocimientos sobre el impacto que las actividades industriales y agrícolas tienen sobre los ecosistemas regionales a partir del monitoreo ambiental, sino también de avanzar en la investigación de técnicas de remediación. Algunos de los métodos convencionales (precipitación, intercambio iónico, carbono activado, entre otros) son ineficaces y costosos cuando el volumen de aguas residuales a tratar es elevado y la concentración de iones metálicos a ser removidos es baja ($1-100 \text{ mgL}^{-1}$) (Wang y Chen, 2009). De este modo, la necesidad de desarrollar métodos eficientes y económicamente convenientes para la eliminación de contaminantes ha motivado el desarrollo de nuevas tecnologías. En el año 1960 surgió una alternativa a los tratamientos convencionales, que consistió en el empleo de sistemas "bacterianos-algáceos". El concepto de tratamiento de efluentes integrado por estos dos sistemas fue creado por William Oswald (Oswald, 1988). En la segunda mitad de los años 80 se fortalece el interés por investigar el aprovechamiento de la biomasa algal para distintas aplicaciones (Albeliovich, 2004).

Este campo continúa aún abierto a nuevos descubrimientos. En este sentido, numerosos investigadores trabajaron en comparar las ventajas y desventajas de las diferentes técnicas de remediación, y propusieron tecnologías alternativas (Volesky, 2001; Lesmana y col., 2009; Hashim y col., 2011). Una de ellas es la biosorción, que consiste en el empleo de materiales de origen biológico, tales como bacterias, hongos, levaduras, microalgas y macrófitas, para secuestrar metales y otros elementos. Según Wang y Chen (2006), los biosorbentes pueden retener metales de manera rápida y eficiente, reduciendo concentraciones desde el orden de los ppm a niveles de ppb. Dicha eficiencia depende principalmente del tipo de material

empleado, de los componentes de la solución y de sus características fisicoquímicas (Volesky, 2001; Lodi y col., 2010). Actualmente, la biomasa muerta y los residuos agrícolas son los recursos más empleados como biosorbentes, aunque los organismos vivos también demostraron ser aptos para la eliminación de metales pesados (Regaldo y col., 2009; Bajguz, 2011; Piotrowska-Niczyporuk y col., 2012; Regaldo y col., 2013).

Volesky (2007) propone el término bioacumulación cuando se utiliza biomasa viva, cuyos mecanismos de acción dependen de una rápida adsorción pasiva, que se continúa por una acumulación activa posterior más lenta. Las microalgas poseen una superficie cargada negativamente, por lo que su afinidad con los metales cargados positivamente es elevada (Oswald, 1988). Sin embargo, para evaluar la factibilidad de utilizar microalgas en tratamientos de efluentes debemos considerar que: se deben buscar alternativas con bajo costo y alta eficiencia, desarrollar procesos eficaces para separar la biomasa algal y rentabilidad en cuanto al aprovechamiento de la misma; de modo que la eficiencia del proceso es un punto clave para determinar su viabilidad.

Teniendo en cuenta la amplitud de la problemática planteada en esta tesis, nos propusimos abordarla por un lado con estudios en campo, y por otro con la aplicación de ensayos a escala de laboratorio, empleando las siguientes herramientas:

a) Monitoreo en campo de parámetros físico-químicos y biológicos que brindan información sobre el estado de calidad del recurso acuático y la estructura y dinámica de la comunidad zooplanctónica.

b) Aplicación de bioindicadores representativos de la comunidad planctónica, pertenecientes a dos eslabones importantes de las redes tróficas: productores y consumidores primarios. En este sentido, analizamos a escala de laboratorio el efecto de metales pesados y plaguicidas de amplio uso a nivel mundial, no sólo sobre el crecimiento poblacional de un organismo productor (*Chlorella vulgaris*, Beijerinck Novakova, 1890), sino también sobre atributos de historia de vida de cladóceros representativos la fauna Neotropical y del Litoral Fluvial Argentino: *Moinodaphnia macleayi* (King, 1853) (Fam. Moinidae) y *Ceriodaphnia dubia* (Richard, 1894) (Fam. Daphnidae). Consideramos importante comparar estos resultados con los obtenidos en ensayos con *Daphnia magna* (Straus, 1820) (Fam. Daphnidae), una especie de distribución holártica, que si bien es utilizada universalmente como organismo prueba, no son representantes de la diversa fauna de cladóceros neotropical (Paggi, 1998).

c) Aplicación de técnicas de microscopía electrónica de barrido (SEM) y microanálisis XEDS (X rays energy dispersive spectrometry) con el fin de analizar variaciones en la acumulación y posibles zonas de depósito de Cr, Cu y Pb en *C. vulgaris* y en *D. magna*.

d) Empleo de microalgas como modelo biológico para pruebas de bioremediación a escala de laboratorio.

3.2.- OBJETIVOS

Objetivo General

El objetivo general de la presente tesis es abordar la problemática de la contaminación por metales pesados y plaguicidas en ecosistemas de agua dulce de la región sobre organismos planctónicos de diferente nivel trófico -productores y consumidores primarios-, así como la eficiencia de acumulación de dichos contaminantes por microalgas a escala de laboratorio.

La información generada podrá ser utilizada para implementar medidas tendientes a la disminución del impacto de la contaminación con metales pesados y plaguicidas en los ecosistemas acuáticos locales. Estudios como el que se propone han recibido poca atención, siendo necesario el aporte de este tipo de información para emprender nuevas estrategias para la protección y remediación.

Objetivos Específicos

1. En estudios de campo, analizar comparativamente la diversidad (en sus componentes de riqueza y abundancia) de la comunidad zooplanctónica de sistemas acuáticos afectados por herbicidas y de un sistema de referencia.

2. Estudiar comparativamente el efecto crónico y agudo de metales pesados (Cr, Cu y Pb) sobre atributos de historia de vida (sobrevivencia, crecimiento, fecundidad y edad de primera reproducción) de cladóceros planctónicos.

3. Analizar zonas de depósito de Cr, Cu y Pb en un organismo productor (*Chlorella vulgaris*) y en un organismo consumidor (*Daphnia magna*) por medio de SEM (Scanning Electron Microscopy) y XEDS (X rays energy dispersive spectrometry).

4. Determinar a escala de laboratorio la capacidad de acumulación de metales pesados por *Chlorella vulgaris* a partir de efluentes obtenidos en plantas industriales (Ej: curtiembres, metalúrgicas, fábricas de baterías, galvanoplastias, etc.), y de soluciones enriquecidas con diferentes concentraciones de Cu y Pb y analizar su efecto sobre el crecimiento poblacional.

5. Determinar la capacidad de acumulación de herbicidas por *Chlorella vulgaris* a escala de laboratorio y analizar su efecto sobre el crecimiento poblacional.

Nota: A los objetivos inicialmente planteados, se introdujeron las siguientes modificaciones:

- **Objetivo 1:** En estudios de campo se optó por analizar en agua Atrazina y Endosulfán y no solamente herbicidas como fue propuesto inicialmente. Además de plaguicidas, se estudiaron microcontaminantes inorgánicos (Cr, Cu, Pb y As) en agua y sedimentos. Se optó por realizar un seguimiento temporal (anual con muestreos mensuales) en lugar de seleccionar un sitio de referencia, dado que la región estudiada posee un alto grado de impacto antrópico. Se incluyeron solamente análisis cualitativos de zooplancton.

- **Objetivo 2:** Se estudió tanto el efecto agudo como el crónico de Cr, Cu y Pb sobre atributos de historia de vida: supervivencia, fecundidad, madurez sexual y crecimiento en dos cladóceros neotropicales *Moinodaphnia macleayi* y *Ceriodaphnia dubia*, y uno holártico (*Daphnia magna*).
- **Objetivo 5:** Se optó por evaluar plaguicidas (Atrazina, Endosulfán y Glifosato) y no solamente herbicidas como fue propuesto inicialmente.

3.3.- HIPOTESIS

Las hipótesis que se plantearon se expresan a continuación:

1. En estudios de campo, la diversidad del zooplancton será afectada negativamente por actividades antrópicas (agrícolas e industriales).
2. Los metales pesados: Cr, Cu y Pb afectan negativamente atributos de historia de vida (fecundidad, crecimiento, sobrevivencia, edad de primera reproducción) de especies de microcrustáceos planctónicos en ensayos de toxicidad agudos y crónicos.
3. Los metales pesados: Cr, Cu y Pb forman depósitos sobre el exoesqueleto, mudas y efipios de *D. magna* y sobre *C. vulgaris*, identificables mediante microfotografías electrónicas y XEDS.
4. A escala de laboratorio, *Chlorella vulgaris* acumula metales pesados a partir de efluentes industriales y de soluciones experimentales enriquecidas con Cu y Pb que afectan negativamente su crecimiento poblacional.
5. A escala de laboratorio, *Chlorella vulgaris* acumula plaguicidas a partir de soluciones enriquecidas con endosulfán y atrazina, que afectan negativamente su crecimiento poblacional.

CAPÍTULO I

Contexto ambiental.

La ecotoxicología y sus herramientas de análisis para el control y monitoreo

- **Materiales y Métodos**
- **Resultados**
- **Discusión parcial**



4.- MATERIALES Y METODOS

4.1.- Contexto ambiental

4.1.1.- Área de estudio

El río Coronda se origina en la provincia de Santa Fe a partir de los aportes del río Salado y del A° Santa Fe, y desagua en el Carcarañá, río alóctono proveniente de las sierras de Córdoba, formando parte del sistema aluvial del río Paraná. Esta cuenca constituye el desagüe natural de las lagunas El Capón o Pedro al norte, la que afluye el río Saladillo Dulce; arroyo De Leyes en el centro, que recibe las aguas de crecida del río San Javier, y la laguna Setúbal, que enmarca por el este a la ciudad de Santa Fe.

A su vez, el río Coronda recibe los aportes del sistema A° Colastiné-Corralito, cuenca exorreica ubicada en el centro-sur de la provincia de Santa Fe, al sur de la llanura Platense en la subregión llanura Pampeana. La misma drena un área de aproximadamente 6.490 km² siendo la hidrografía del área típica de la llanura santafesina, con cursos de agua dependientes de precipitaciones. Este sistema está formado por los arroyos Colastiné (cauce principal), con su nacimiento en el centro-este del departamento Castellanos y en el centro-oeste del departamento Las Colonias. A su vez, recibe un importante caudal de un arroyo secundario denominado Corralito que hace su aporte al Colastiné en el distrito Santa Clara de Buena Vista perteneciente al departamento Las Colonias y cuyo nacimiento se remonta a canales secundarios que colectan las aguas del sur del Departamento Castellanos y norte del Departamento San Martín. También aportan a este sistema los canales Saguier, Irigoyen y Principal Sastre, entre otros. (Fig. 1 y 2) (Subsecretaría de recursos hídricos de la República Argentina. Atlas digital de Cuenclas y Regiones Hídricas Superficiales de la República Argentina, 2010).

La Cuenca Colastiné-Corralito ocupa un área de 750 ha., abarca 48 localidades y parajes de la provincia de Santa Fe. Es atravesada en sentido Norte-Sur por dos rutas nacionales la RN N°11 y la RN N° 34, y en sentido Este-Oeste por la RN N° 19. Además pasan por allí las vías férreas del Ferrocarril Nuevo Central Argentino (ex FC. Mitre) y la vía del Ferrocarril General Belgrano. Con respecto a las rutas provinciales tenemos en el sentido Norte – Sur a la Autopista Brigadier López AO1, las RP N° 6, RP N° 10, RP N° 13 y en el sentido Este – Oeste la RP N° 80, RP N° 70, la RP N° 64 y la RP N° 41S (Castelao y Glur, 2012).

Este sistema se desarrolla sobre rocas cristalinas del macizo de Brasilia, donde se asienta una gruesa capa formada por polvo llevado por el viento desde las regiones montañosas del oeste que constituye el loess pampeano, así como sedimentos marinos productos de las transgresiones marinas cenozoicas, cubiertos finalmente por una capa húmifera de extraordinaria fertilidad.

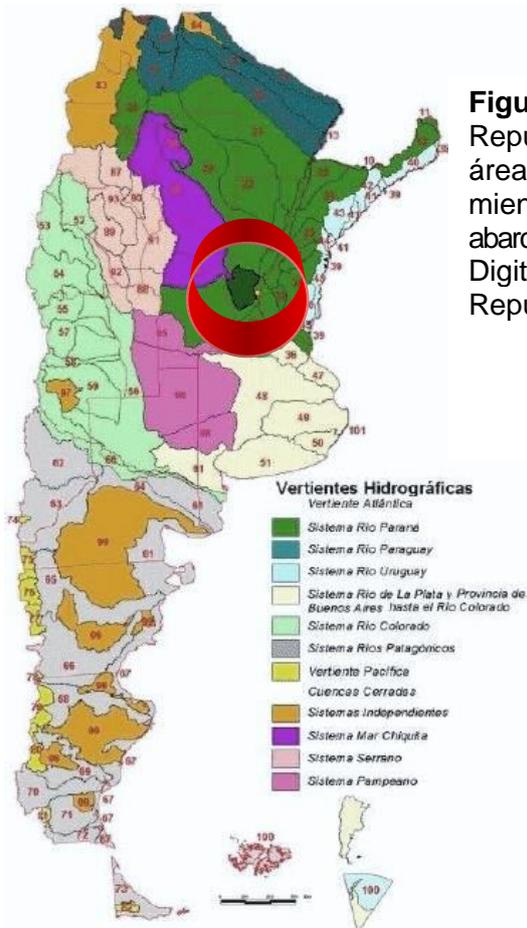
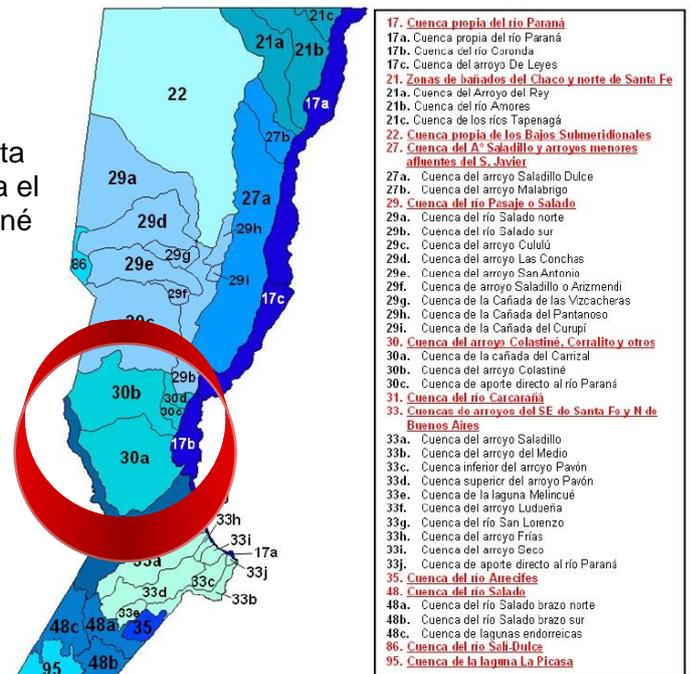


Figura N° 1: Cuencas Hidrográficas de la República Argentina. El color verde claro señala el área que ocupa el sistema del Río Paraná, mientras que el verde oscuro indica el área que abarca la Cuenca Colastiné – Corralito. Fuente: Atlas Digital de los recursos Hídricos superficiales de la República Argentina. Versión 2002.

Figura N° 2: Cuencas superficiales y regiones hídricas de la provincia de Santa Fe (escala: 1:250.000). El nro. 30 señala el área que ocupa la cuenca del A° Colastiné –Corralito en la provincia de Santa Fe. Fuente: Atlas digital de Cuencas y Regiones Hídricas Superficiales de la República Argentina. Versión 2010.



Dadas las condiciones climáticas y geomorfológicas de la cuenca, el sector primario encuentra en estas tierras condiciones óptimas para desarrollar su actividad, ya que es

considerada la zona de mayor producción agrícola de la provincia con predominancia de cultivos de soja, girasol y maíz. Otro cultivo importante es el de la frutilla, restringido a la localidad de Coronda (departamento de San Jerónimo) (Giunta y col., 2005; Dente y Martínez: Atlas digital de Cuencas y Regiones Hídricas Superficiales de la República Argentina, 2010).

Teniendo en cuenta el desarrollo de dichas actividades, es posible que los agroquímicos empleados en el área de estudio alcancen los ambientes acuáticos por escorrentía y/o infiltración. Esta cuenca recibe además efluentes cloacales (descargas de camiones atmosféricos) e industriales que aportan materiales orgánicos e inorgánicos (entre ellos metales pesados). En el área de estudio se concentra casi la totalidad de las industrias lácteas instaladas en la provincia y gran parte de las industrias derivadas de la actividad agrícola-ganadera (frigoríficas, alimenticias, curtiembres, etc.), cuyos efluentes líquidos son vertidos en canales, cañadas y arroyos de la zona siendo su destino final la cuenca del A^o Colastiné-Corralito y consecuentemente el río Coronda (Informe Subsecretaría de Medio Ambiente y Ecología, 1998).

Es así que la utilización de los cursos de agua superficiales como medio de transporte para evacuar líquidos residuales rurales, urbanos e industriales es, lamentablemente, la aplicación más difundida y generalizada para todos los cursos de aguas superficiales de la cuenca. Sin embargo, en los últimos años se ha impuesto el concepto de "uso múltiple del agua", según el cual la utilización de una masa de agua para un propósito dado no debe perjudicar los otros usos posibles, entre los que figuran la preservación de la vida acuática y las actividades recreativas (Fontaine y Lesht, 1987, en Tortorelli y Hernández, 1995).

Entre los usos que se hacen de esta cuenca y de su afluente el río Coronda, cabe mencionar las actividades recreativas de caza y pesca, la instalación de balnearios y la reciente presentación de proyectos de acueductos, donde están programadas obras públicas de toma y potabilización de agua que abastecerá a una población de más de 100.000 habitantes, residentes en 32 localidades de la provincia de Santa Fe. (Portal de noticias del Gobierno de la provincia de Santa Fe: <http://www.santafe.gov.ar/>)

4.1.2.- Sitios de muestreo

Se seleccionaron cuatro sitios de muestreo correspondientes a provincia de Santa Fe: Sitio uno (S1): Canal Santa María (canalización del A^o Colastiné): punto cercano a la localidad de Coronel Rodríguez (31° 43' 03,3" S/61° 10' 01,1" O). Sitio dos (S2): A^o Corralito: Puente ubicado sobre RP N° 10 entre las localidades de López y Santa Clara de la Buena Vista (31° 47' 13.44" S /61° 18' 40" O). Sitio tres (S3): A^o Colastiné: punto posterior a la confluencia del canal Santa María y el A^o Corralito, entre la localidad de Gessler y Loma Alta, sobre puente ubicado en RP N° 6 (31° 54' 36.80" S/61° 08' 49.54" O). Sitio cuatro (S4): A^o Colastiné: punto



Figura Nº 4: Sitio uno.- Canal Santa María - Aº Colastiné: punto cercano a la localidad Coronel Rodríguez, provincia de Santa Fe (Argentina).



Figura Nº 5: Sitio dos.- Aº Corralito: ubicado entre la localidad de López y Santa Clara de la Buena Vista, provincia de Santa Fe (Argentina).



Figura N° 6: Sitio tres.- A° Colastiné: tramo posterior a la confluencia del canal Santa María y el A° Corralito. Entre la localidad de Gessler y Loma Alta. Santa Fe (Argentina).



Figura N° 7: Sitio cuatro.- A° Colastiné: cercano a la desembocadura en el Río Coronda. Entre la Localidad de Coronda y Arocena. Santa Fe (Argentina).

4.1.3.- Determinación de parámetros ambientales

Tanto el registro de parámetros ambientales como la extracción de muestras de zooplancton fueron realizados durante un año, con una periodicidad mensual comenzando en agosto de 2011 y finalizando en agosto de 2012.

Los parámetros ambientales medidos en agua fueron: velocidad de la corriente (m seg^{-1}); temperatura ($^{\circ}\text{C}$); profundidad (m); sólidos totales suspendidos -STS- (g L^{-1}); pH; transparencia (disco de Secchi, m); conductividad (μScm^{-1}); oxígeno disuelto ($\text{mg L}^{-1} \text{O}_2$); demanda química de oxígeno -DQO- ($\text{mg L}^{-1} \text{O}_2$); demanda biológica de oxígeno -DBO- ($\text{mg L}^{-1} \text{O}_2$); nitratos ($\text{mg L}^{-1} \text{NO}_3$); nitritos ($\text{mg L}^{-1} \text{NO}_2$), fósforo reactivo soluble -PRS- ($\text{mg L}^{-1} \text{P}$); carbono orgánico total (TOC) (mg L^{-1}) y clorofila *a* ($\mu\text{g L}^{-1}$). En agua se analizaron las concentraciones de metales pesados (Cr, Cu, Pb), As y plaguicidas (Atrazina y Endosulfán), mientras que en sedimento se registraron sólo metales pesados y As.

En el presente estudio se han adoptado, como criterio base para evaluar la calidad de las aguas de la cuenca, los límites Canadienses establecidos para preservar la vida acuática (Canadian Environmental Quality Guidelines, 2003) y los establecidos por la Subsecretaría de Recursos Hídricos de la República Argentina (2003 a y b, 2004 a y b y 2005 a y b) (Tabla 2).

Como estudio complementario se consideró importante analizar comparativamente normativas referidas al control fitosanitario en Argentina, Santa Fe y San Carlos Centro (ciudad localizada en nuestra área de estudio). Para la recolección de datos se realizaron entrevistas a funcionarios de San Carlos Centro encargados de gestionar temas que atañen al ambiente con el fin de dilucidar los problemas ambientales y la forma de abordarlos. A partir de páginas web oficiales de diferentes entidades gubernamentales, se relevaron normativas provinciales y nacionales (Ley de Medio Ambiente y Desarrollo Sustentable de la provincia de Santa Fe N° 11.717/1999, Ley Nacional General del Ambiente 25.675/2002, Ley Provincial de productos Fitosanitarios N° 11.273/1995, entre otras), relacionadas con el cuidado del ambiente, especialmente aquellas que regulan el uso y almacenamiento de productos fitosanitarios, en tanto que las reglamentaciones locales fueron consultadas en el municipio de la ciudad mediante entrevistas a funcionarios públicos. En dichos encuentros, se participó de debates en sesiones del Concejo de la ciudad de San Carlos Centro en torno a dicha problemática, proponiendo acciones tendientes a mitigar el efecto negativo de prácticas agrícolas inadecuadas.

A su vez, se realizaron entrevistas a encargados de locales de venta, con el fin de recaudar información sobre: los plaguicidas empleados frecuentemente en el área de estudio, la dosis aplicada (L ha^{-1}) y fechas de pulverizaciones. Además, se indagó acerca del asesoramiento que ellos brindan a los productores, sobre el empleo de buenas prácticas agrícolas. Se relevó información sobre la ocurrencia e intensidad de precipitaciones en los sitios estudiados (promedios mensuales, mm): datos Pluviométricos: <http://www.santa->

fe.gov.ar/gbrn/regpluv/) ya que las mismas pueden modificar la concentración de plaguicidas en sistemas de agua dulce (Peruzzo y col., 2008).

4.1.3.1.- Toma y procesamiento de las muestras

Muestras de agua

Para la determinación de los metales pesados (Cr, Cu, Pb), As y plaguicidas (Atr y End) se tomaron 96 muestras de agua, aproximadamente 10 cm debajo de la superficie. Para análisis de microcontaminantes inorgánicos (Cr, Cu, Pb y As) se utilizaron 48 botellas plásticas previamente lavadas con HNO₃ (10% v/v) y luego enjuagadas con agua deionizada. Mientras que para análisis de plaguicidas se emplearon 48 botellas de vidrio color ambar. Las botellas fueron enjuagadas dos veces con agua de río antes de ser llenadas. Las muestras de agua para determinar STS, DQO, DBO, NO₃⁻, NO₂⁻, PRS y TOC fueron colectadas en botellas de plástico, lavadas mediante agua deionizada y enjuagadas dos veces con agua de río previo a su llenado. Estas se guardaron refrigeradas 24 h a 4°C hasta su análisis.

Las mediciones de campo, incluyendo temperatura del agua, pH, conductividad y oxígeno disuelto se realizaron utilizando un equipo portátil multiparamétrico LabQuest Vernier.

Muestras de sedimentos

Se tomaron un total de 48 muestras de sedimentos de superficie mediante una draga manual tipo "mud-snapper" con una superficie efectiva de extracción de 100 cm², se colocaron en recipientes plásticos y almacenaron refrigeradas a 4 °C hasta ser digeridas para su posterior análisis.

4.1.3.2.- Análisis químicos y fisicoquímicos en agua y sedimentos

Determinación de la concentración de metales pesados y As en agua

La concentración de metales y As en agua se determinó de acuerdo a Martin y Col. en EPA (1994). Se tomó una muestra de agua en cada sitio, que fue acidificada con ácido nítrico (pH < 2). Para la determinación de Cr, Cu, Pb y As totales recuperables una alícuota de 100 mL fue transferida de cada muestra homogeneizada y preservada en medio ácido en un erlenmeyer de 250 mL. Se agregaron 2 mL de ácido nítrico y 1 mL de ácido clorhídrico. Los erlenmeyers se colocaron sobre plancha calefactora a 85 °C para evaporación. El volumen de las muestras se redujo aproximadamente a 20 mL. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente; las soluciones fueron transferidas cuantitativamente a recipientes de 100 mL para completar el volumen de agua de análisis y mezcladas cuidadosamente.

Determinación de la concentración de metales pesados y As en sedimentos

Para la determinación de analitos recuperables en sedimentos, la muestra (porción > 20 g) fue secada hasta peso constante a 60 °C. Luego para lograr homogeneidad fueron molidas en un mortero. A partir del material seco y homogéneo se pesaron alícuotas de 1.0 ± 0.01 g de cada muestra y se transfirieron a erlenmeyers de 250 mL para la extracción ácida; se agregaron 4 mL de HNO_3 y 10 mL de HCl. Los recipientes se cubrieron con vidrios de reloj. Fueron colocados en plancha calefactora para la extracción de los analitos. Las muestras se calentaron y agitaron suavemente durante 30 minutos, hasta obtener un volumen aproximado de 3-4 mL. Luego se dejaron enfriar y se transfirió el extracto a un matraz, filtrándolo previamente para eliminar los silicatos insolubles y completando luego el volumen a 50 mL con agua destilada ultrapura.

Determinación de la concentración de plaguicidas en agua

Se determinó Atr mediante cromatografía líquida de alta resolución (UHPLC) acoplada a una fuente de ionización por electrospray con detección/cuantificación por espectrometría de masas en tándem (MS/MS). Previo a la inyección cromatográfica las muestras de agua fueron sometidas a un proceso de preparación y limpieza por extracción en fase sólida (SPE) basado en el método descrito por Min y col. (2008). Se evaluaron además los aspectos relacionados a la metodología cromatográfica, fases móviles, condiciones de ionización y variables operativas de fragmentación/detección del espectrómetro de masas tipo triplecuadrupolo en modo de monitoreo de reacción múltiple (MRM). La separación se realizó en una columna de rápida resolución (C18, 2.1 mm x 100 mm, 1.7 μm) empleando elución en gradiente, cuya fase móvil fue una mezcla de agua y acetonitrilo ambas con un contenido de 0.1% (v/v) de ácido fórmico. En cuanto a la detección de masas, se utilizaron dos transiciones provenientes del ion pseudomolecular de atrazina ($[\text{M}+\text{H}]^+$, $m/z = 216.1$) para su identificación: $216.1 > 174.1$ y $216.1 > 104.0$, las cuales provienen de las pérdidas de CHCH_3CH_3 y del grupo $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NH}$, además del tiempo de retención, mientras que para su cuantificación se empleó la transición más abundante: $216.1 > 174.1$. Los límites de detección y cuantificación alcanzados fueron de $0.001 \mu\text{gL}^{-1}$ y $0.002 \mu\text{gL}^{-1}$, respectivamente. Se validó la metodología propuesta, realizando estudios de recuperación, repetitividad, reproducibilidad y eficiencia de ionización. Además, se evaluó la influencia de la matriz sobre la señal del analito realizando curvas de calibrado en solvente y matriz.

El End total (α END, β END y END sulfato) fue determinado por Cromatografía Gaseosa (GC - ECD) siguiendo el método ASTM D 6520-06 propuesto por APHA (1976). Los límites de detección y cuantificación alcanzados fueron de $0.002 \mu\text{gL}^{-1}$ y $0.004 \mu\text{gL}^{-1}$ para α END; $0.010 \mu\text{gL}^{-1}$ y $0.020 \mu\text{gL}^{-1}$ para β END y $0.030 \mu\text{gL}^{-1}$ y $0.060 \mu\text{gL}^{-1}$ para END sulfato.

Determinación de: demanda química de oxígeno (DQO), demanda biológica de oxígeno (DBO), nitratos (NO₃-), nitritos (NO₂-), fosforo reactivo soluble (PRS), carbono orgánico total (TOC) y clorofila a (µgL⁻¹)

Estos parámetros fueron medidos en el agua de los sitios muestreados siguiendo metodologías estandarizadas propuestas en protocolos internacionales:

DQO: las determinaciones se realizaron siguiendo el método 410.1 (APHA, 1975). Se empleó como agente oxidante dicromato de potasio en una solución de ácido sulfúrico (50 %) a temperatura controlada. Además se agregó sulfato de plata como catalizador y se añadió sulfato mercurico para eliminar las interferencias de los cloruros. El exceso de dicromato se valoró con sulfato de amonio ferroso estándar, utilizando un complejo ferroso como indicador.

DBO: las determinaciones se realizaron siguiendo el método 405.1 (5 días, 20 °C) (APHA, 1980). Las muestras fueron incubadas en condiciones de oscuridad durante 5 días, luego mediante el test de Winkler se registró la reducción de la concentración de oxígeno disuelto en este período.

NO₃-, NO₂- y PRS: las determinaciones se llevaron a cabo siguiendo las técnicas SM 4500-P-E, SM 4500- NO₂-B y SM 4500- NO₃-D propuestas por APHA (1998). Parte de las muestras fueron analizadas personalmente en el Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (INTEC I, CONICET-UNL), mientras que algunas de ellas fueron derivadas al Laboratorio de Química Analítica de la Facultad de Ingeniería Química (UNL).

TOC: las determinaciones se realizaron siguiendo el método 415.1 propuesto por APHA (1975). Se tomaron 50 mL de muestra y acidificaron con ácido clorhídrico hasta pH ≤ 2. Luego las lecturas se realizaron con aparato TOC (Total Organic Carbon Analyzer)- 5000-A (Shimadzu).

Clorofila a: se determinó según el método estándar propuesto por APHA y col. (1988). Se filtraron rangos de volúmenes entre 500 y 1000 mL empleando filtros Whatman GF/C, la extracción de la misma se realizó con acetona al 90 %. La concentración se determinó por Espectrofotometría.

STS: las detreminaciones se realizaron según el método 160.3 propuesto por APHA (1975). Alícuotas de 50 ml de muestra (previamente homogeneizada) fueron colocadas en cápsulas de porcelana y secadas hasta peso constante a 103-105°C, luego por diferencia de peso se estimaron los STS con una balanza analítica de alta resolución (Rangos de determinación 10 mgL⁻¹ – 20.000 mgL⁻¹).

4.1.3.3.- Instrumental empleado para análisis de metales pesados y arsénico

La concentración de Cr, Cu, Pb y As se midieron de acuerdo a Creed y col., en Environmental Protection Agency, (1994) con un espectrofotómetro de absorción atómica marca Perkin Elmer (modelo PE 8000) equipado con horno de grafito, usando técnicas estandarizadas para la calibración. Los límites de detección fueron > 5 µgL⁻¹ para Cr, Cu y Pb,

y $> 2 \mu\text{gL}^{-1}$ para As. La totalidad del material utilizado fue lavado con ácido para el análisis de metales. Se emplearon reactivos de calidad analítica certificados. Se realizaron blancos para todos los análisis. La calibración de los blancos fue controlada al comienzo y final de las determinaciones para cada grupo de muestras de cada metal para comprobar el posible nivel de variación en la calibración del instrumental.

4.1.3.4.- Análisis numérico y estadístico de datos químicos y fisicoquímicos en agua y sedimentos

Previamente a los análisis, se corroboró la normalidad de la distribución de los datos y la homogeneidad de las varianzas utilizando el test Kolmogorov-Smirnov y Barlett, respectivamente. Se aplicó Análisis de la Varianza (ANOVA) de una vía y post test de Bonferroni para determinar posibles diferencias significativas entre los parámetros fisicoquímicos, concentraciones de metales, As y plaguicidas registrados en cada sitio y entre los diferentes meses. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando $p < 0,05$. Se aplicó análisis de correlación de Spearman para apreciar la relación entre la conductividad y el promedio de precipitaciones mensuales para cada sitio. A su vez, se aplicó el test no paramétrico de Mann-Whitney para analizar variaciones estacionales de clorofila *a*. Se emplearon test de Correlación Lineal para establecer comparaciones entre distintos parámetros ambientales.

4.2.- Toma y procesamiento de las muestras de zooplancton

4.2.1.- Puesta a punto de la metodología de muestreo

Dada la complejidad y especificidad del trabajo con zooplancton, con anterioridad al desarrollo de los muestreos sistemáticos, se contempló el desarrollo de una etapa previa en la que se verificó la existencia y buen estado de los materiales necesarios. También se construyeron los muestreadores a emplear y se puso a prueba su eficiencia en campo.

Se realizó una prueba de los análisis químicos arriba mencionados, para poner a punto la metodología de laboratorio, con excepción de los correspondientes a espectrometría de absorción atómica. Dada la talla extremadamente reducida de los organismos del zooplancton (entre 30 y 1500 μm), frecuentemente surgen dificultades metodológicas vinculadas fundamentalmente a la determinación taxonómica de rotíferos, cladóceros y copépodos. En este sentido, dentro de la etapa de puesta a punto de la metodología, se realizó un análisis cualitativo de reconocimiento de las especies zooplanctónicas presentes en el sistema.

4.2.2.- Muestreo de zooplancton y análisis taxonómico

Los muestreos de zooplancton, así como los de agua y sedimentos, se realizaron en forma simultánea. En cada sitio se tomaron tres muestras (réplicas) de zooplancton con una trampa

de Schindler-Patalas de 20 L provista de malla de 45 μm . A su vez se tomó en cada sitio una muestra con red de plancton (45 μm) para realizar un estudio cualitativo de la comunidad zooplanctónica. Todas ellas fueron fijadas con formol y coloreadas con eritrosina en campo.

Si bien inicialmente en el presente trabajo se propuso realizar un análisis cuali-cuantitativo de la fracción animal de la comunidad zooplanctónica, en esta tesis no se presentan los resultados cuantitativos, aunque sí se realizó un estudio cualitativo. En una etapa posterior se planea realizar los recuentos de las muestras de zooplancton tomadas en campo.

Para efectuar el análisis cualitativo, la identificación taxonómica se llevó a cabo con Lupa Binocular (Motic SMZ-168), microscopio óptico (Olympus Cx31) y uso de claves específicas (Ahlstrom 1940 y 1943; Ringuelet, 1958; Reid, 1985; Koste y Shiel, 1989; Paggi, 1995; José de Paggi, 1995, entre otros). Los rotíferos correspondientes a la Subclase Monogonontha fueron identificados a nivel de especie salvo algunas excepciones en donde las determinaciones se efectuaron a nivel de género debido a las dificultades de reconocimiento por la escasez de material o por el estado de contracción de los ejemplares (e.g. *Asplanchna*; *Cephalodella*). Los rotíferos correspondientes a la Subclase Bdelloidea no fueron clasificados a nivel genérico, sino identificados como morfoespecies diferentes dentro de la subclase. En los casos en que las determinaciones taxonómicas así lo requirieron, se observó con grandes aumentos el trophi, estructura quitinosa interna que se obtiene luego de aplicar hipoclorito de sodio al ejemplar, para destruir el material blando (Pennak, 1989; José de Paggi, 1995).

Los Copépodos fueron identificados a nivel de Orden (Cyclopoida, Calanoida y Harpacticoida). Para su determinación taxonómica se colocaron en una gota de glicerina de concentración progresiva. En primer lugar se observó sobre el animal entero sin comprimir: largo total, largo relativo del cefalotórax y el abdomen, posición y número de los sacos ovígeros, ornamentación del segmento genital, quetotaxia (dientes, espinas, etc.), tipos de setas y espinas en los distintos apéndices, implantación de las setas furcales y, en el caso de los Harpacticoida, forma del rostro.

Los Cladóceros fueron identificados a nivel de especie salvo algunas excepciones en donde las determinaciones se efectuaron a nivel de género. Para la determinación taxonómica, cuando fue necesario se realizó la disección del ejemplar bajo microscopio estereoscópico y la observación de las estructuras con valor taxonómico bajo microscopio óptico (Paggi, 1995).

Dado que los ambientes acuáticos estudiados son de escasa profundidad, además de las especies típicamente planctónicas (*Daphnidae*, *Asplanchnidae*, copépodos Calanoideos) suelen ocurrir especies que no pertenecen al plancton en sentido estricto, sino que son de hábitos litorales y bentónicos (*Macrothricidae*, *Chydoridae*, copépodos Harpacticoides, rotíferos Bdelloideos), pero que por su importancia no pueden dejar de considerarse, siendo entonces más complejo el análisis de la fracción animal del plancton.

5.- RESULTADOS

5.1.- Contexto ambiental

En cuanto a las herramientas técnicas y jurídicas que regulan el uso racional y sustentable de agroquímicos, la legislación Nacional contempla la Ley 20.418 junto con sus predecesoras N° 18.073 y 18.796. Según Pastorino (2009), estas leyes no tuvieron en cuenta la división de competencias federales y locales, pretendiendo una aplicación en todo el ámbito territorial. Actualmente a nivel nacional este tema está regulado en la resolución N° 507 de 2008 que reformó la res. N° 253 (2003), y ambas modificaron la ley 20.418 de 1973. A nivel Provincial, contamos la Ley de Control Fitosanitario N° 11.273 (1995) y su decreto reglamentario 552/97, cuya función es regular las actividades relacionadas con el ciclo de vida de los productos fitosanitarios. Además, existen otras normas como las Leyes N° 11.354 (1995) y 12.977 (2009) que modifican ciertos aspectos de la norma principal (Ley N° 11.273). A su vez, los decretos 3046/05 y 2856/08 actualizaron ciertas secciones del decreto 552/97.

Consideramos importante el tratamiento de proyectos a nivel local, en donde se tenga en cuenta en la elaboración de normativas las distancias mínimas a las que deben aplicarse plaguicidas de acuerdo a diferentes condiciones climáticas en el momento de aplicación. Respecto a esto, sólo registramos una normativa Nacional aprobada en el año 1964 (la Disposición Conjunta N° 253/64). Se destaca el alto impacto que tendrían ciertas medidas preventivas, tales como la capacitación de agentes sanitarios, productores agrícolas y aplicadores, la educación y la participación responsable de la ciudadanía, y el compromiso de los organismos de gestión y control, especialmente en regiones donde esta actividad tiene gran importancia económica y social.

Las entrevistas realizadas a encargados de locales de venta de agroquímicos en el área de estudio mostraron que el glifosato (herbicida) (48 % - 2.5 lts./ha.) es el producto más vendido en la zona, seguido en importancia por la cipermetrina (insecticida) (25 % - 150 c.c./ha.) y el endosulfán (insecticida) (35 % - 1 lt./ha.), y luego por la atrazina (herbicida) (50 % - 2 lts./ha. y el tebuconazole (fungicida). A partir de la información recaudada obtuvimos datos sobre los cultivos más importantes en la zona, sus fechas de siembra – cosecha, las dosis de agroquímicos aplicadas por hectárea para cada tipo de cultivo, y las fechas en que se realizan dichas aplicaciones.

5.1.1.- Características del agua y sedimento

5.1.1.1.- Parámetros físicos y químicos del agua

La variación de los parámetros físicos y químicos del agua de los sitios de muestreo se muestran en las figuras 8, 9 y 11.

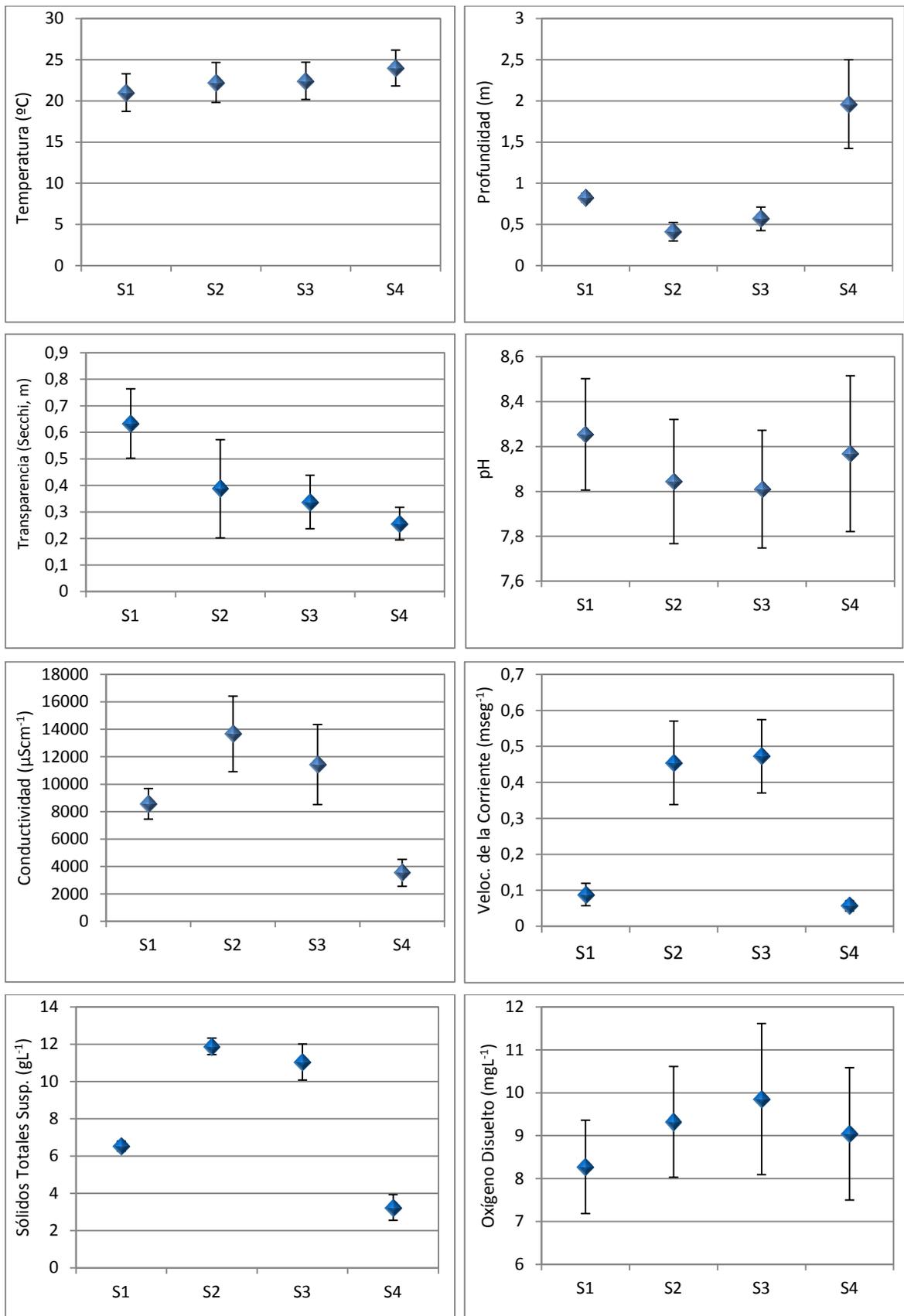


Figura Nº 8: Parámetros físicos y químicos registrados en agua. Los valores de temperatura, profundidad, transparencia, pH, conductividad, velocidad de la corriente, sólidos totales suspendidos y oxígeno disuelto corresponden al promedio anual registrado en cada sitio de

muestreo (S1, S2, S3 y S4) (rombos azules) con sus correspondientes desvíos estándar (barras) (n=12).

La temperatura del agua a lo largo del año varió entre 11-29 °C, con una media de 22,4 ($\pm 1,2$) °C. Entre los registros mensuales, este parámetro mostró una variación acorde a la dinámica estacional normal. Cabe destacar que los muestreos se realizaron a partir de las 7 h. (S1), culminando con los mismos después del mediodía en el sitio cuatro. En este sentido se observó que la temperatura del agua se incrementó progresivamente desde el sitio uno (promedio anual de 21 ± 4 °C) al sitio cuatro (promedio anual de 24 ± 4 °C), mostrando ser significativamente diferente (ANOVA, $p < 0.01$) (Fig. 8)

La profundidad fue en general escasa (< 1 m) en los sitios uno, dos y tres, aunque significativamente superior en el sitio cuatro (ANOVA, $p < 0.001$), donde también se observó mayor dispersión de los datos (Fig. 8). Dicha variabilidad se debe a acciones de dragado que se realizan esporádicamente con el fin de prevenir sucesos como el ocurrido a fines del año 2006 y principios del año 2007, que provocaron la inundación y aislamiento de la Ciudad de Coronda debido al trasvasamiento provocado por el Arroyo Colastiné.

Se registró diferencia en la transparencia del agua entre los sitios muestreados, siendo mayor en S1 y disminuyendo progresivamente en S2, S3 y S4. (ANOVA, S1 vs S3 y S4, $p < 0.05$ y $p < 0.01$, respectivamente) (Fig. 8).

El promedio anual de pH fue 8.25 (± 0.4), 8.04 (± 0.5), 8.01 (± 0.5) y 8.16 (± 0.6), en los sitios 1, 2, 3 y 4, respectivamente. No se registraron diferencias significativas entre ellos (ANOVA, $p > 0.05$). Los valores mínimos se observaron en el mes de febrero en los sitios dos, tres y cuatro (pH: 6.55, 6.59 y 6.32 respectivamente), mientras que los máximos en el mes de enero en los sitios uno y cuatro (pH: 9.07 y 8.97 respectivamente) (Fig. 8).

La conductividad fue alta en todos los sitios estudiados ($>> 1000 \mu\text{S cm}^{-1}$), con promedios anuales de 8576.2, 13666.7, 11429.8 y 3541.6 $\mu\text{S cm}^{-1}$ en S1, S2, S3 y S4 respectivamente (Fig. 9). No se encontraron diferencias significativas entre S2 y S3 (ANOVA, $p > 0.05$), aunque si entre S1 vs S2 y S4, y entre S2 y S3 vs S4 (ANOVA, $p < 0.001$). Como puede observarse fue superior en el sitio dos y tres, alcanzando valores máximos de 18240 y 17330 $\mu\text{S cm}^{-1}$ en el mes de septiembre, consecuencia de la escasez de precipitaciones mensuales (16 y 6 mm respectivamente). En estas condiciones, según Manzi y Gallardo (1970) las sales del suelo ascienden en tiempo seco por capilaridad y descienden con el incremento de las precipitaciones, pudiendo modificar la conductividad de los sistemas acuáticos. En dichos sitios además pudieron observarse bloques de sales en suelo (Fig. 10). En la figura 9 puede apreciarse la relación entre la conductividad y el promedio de precipitaciones mensuales para cada sitio estudiado. Si bien existe una correlación negativa en cada uno de ellos, en S1 y S4 no es significativa: Spearman Rank Correlation: S1 ($r = -0.42$; $p = 0.16$); S2 ($r = -0.58$; $p = 0.04$); S3 ($r = -0.71$; $p = 0.009$) y S4 ($r = -0.26$; $p = 0.4$).



Figura N° 9: Las barras amarillas indican los registros de conductividad ($\mu\text{S cm}^{-1}$) mensual, mientras que la línea azul muestra las variaciones de precipitaciones (promedios mensuales, mm) observados en S1, S2, S3 y S4.

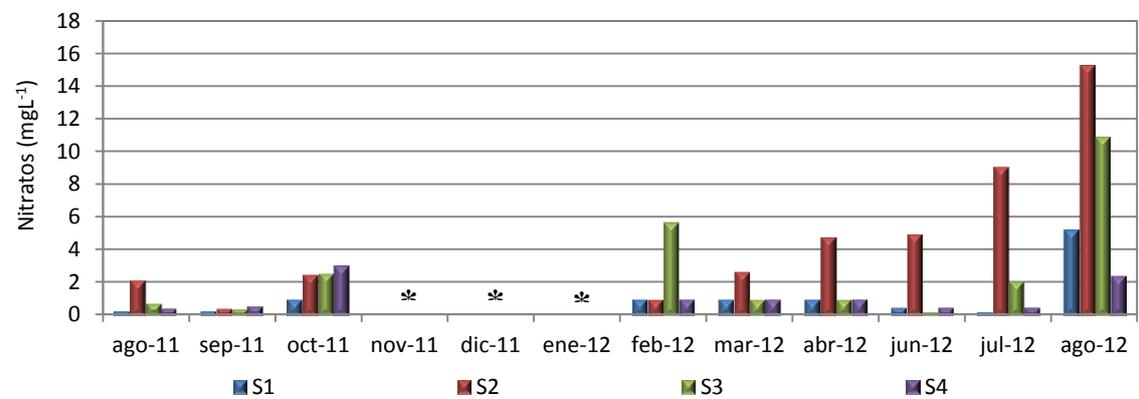
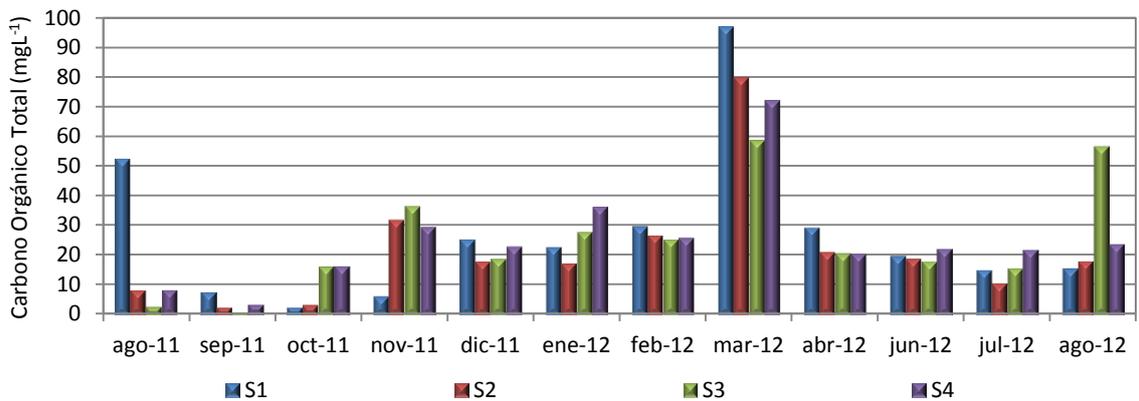
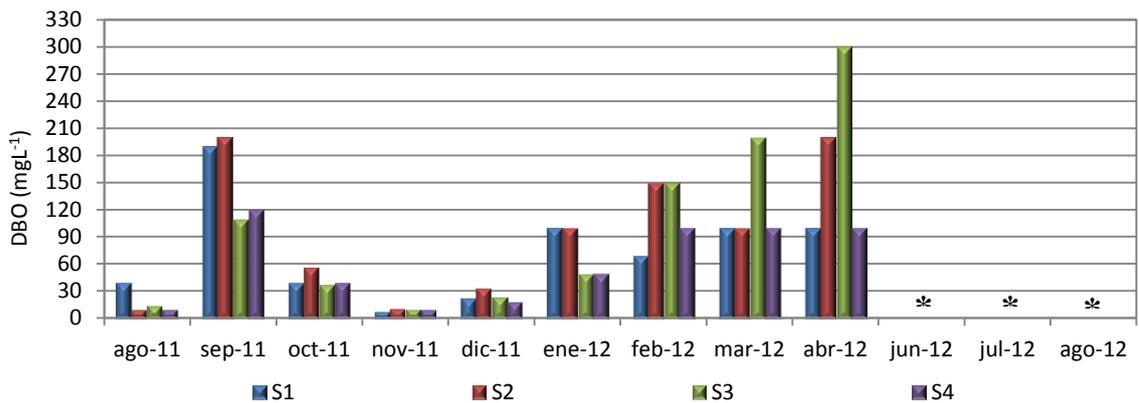
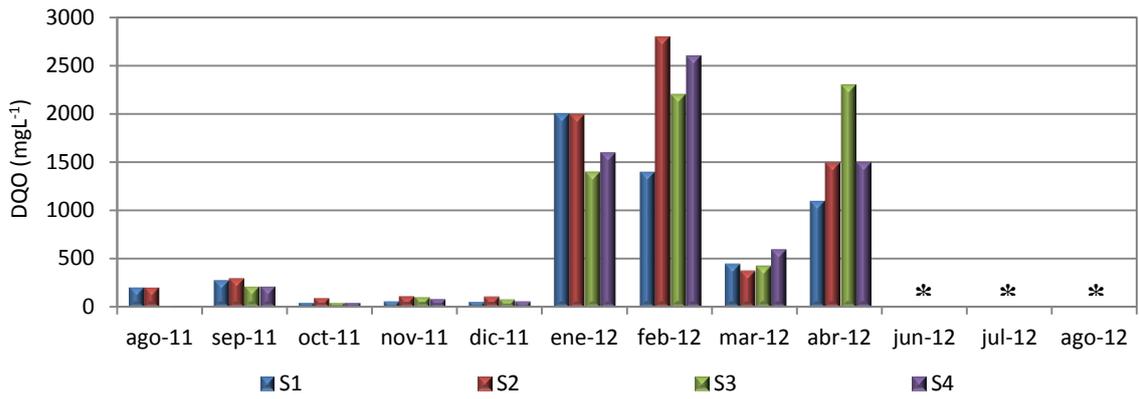


Figura Nº 10: Imagen de suelo del Sitio dos tomada en Septiembre de 2011, caracterizado por presentar arcilla sódica. La capa superficial es ácida, poco agregada, sólo en presencia de un alto contenido sódico se forman bloques. El agua freática cargada de sales afecta el perfil, mostrando variación en su porcentaje salino. Manzi y Gallardo (1970).

El promedio anual de la velocidad de la corriente fue inferior y semejante en los sitios uno y cuatro (0.08 y 0.05 m seg^{-1} , respectivamente), en comparación con los sitios dos y tres (0.45 y 0.47 m seg^{-1} , respectivamente), aunque estos últimos mostraron mayor variabilidad (Fig. 8).

Las concentraciones más altas de sólidos totales suspendidos (STS) se registraron en los sitios dos y tres con un promedio anual de 11.88 (± 0.88) y 11.05 (± 1.9) gL^{-1} , representado en su mayoría por sales. Mientras que en los sitios uno y cuatro el promedio fue inferior: 6.52 (± 0.53) y 3.23 (± 1.37) gL^{-1} . No se registraron diferencias significativas entre los sitios dos y tres, aunque si cuando se establecieron comparaciones entre los demás sitios (ANOVA, $p < 0.001$) (Fig. 8).

Los registros de oxígeno disuelto abarcaron un amplio rango, aunque en su mayoría fueron superiores a 5 mgL^{-1} . Los valores mínimos se observaron los meses de octubre y noviembre en S1 (5.2 y 5.7 mgL^{-1}), y en el mes de noviembre en S4 (4.4 mgL^{-1}), mientras que en los restantes meses los valores fueron semejantes y superiores a dichas concentraciones. No se encontraron diferencias significativas cuando se establecieron comparaciones entre los distintos sitios (ANOVA, $p > 0.05$) (Fig. 8).



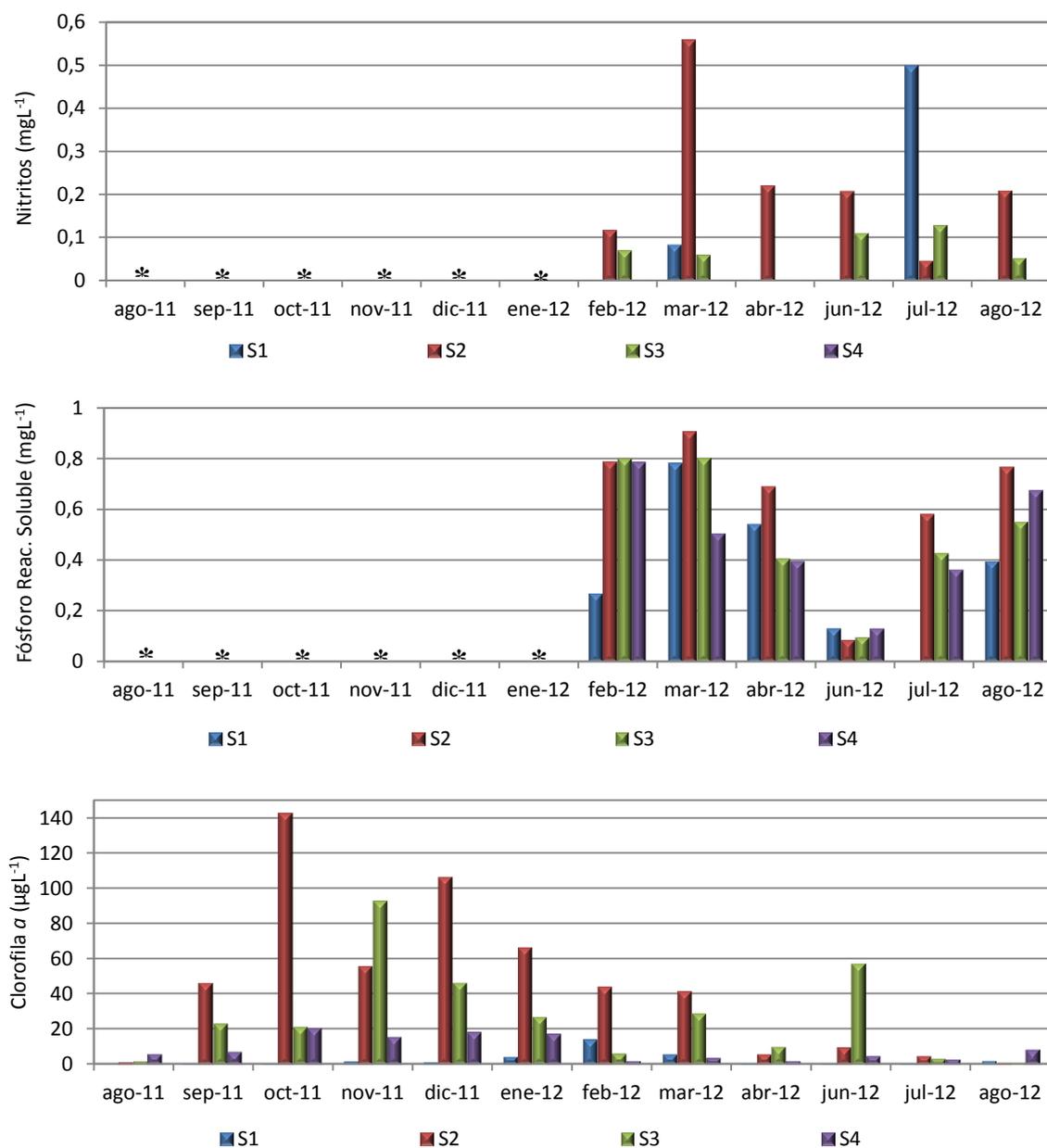


Figura Nº 11: Parámetros químicos registrados mensualmente en cada sitios de muestreo (S1, S2, S3 y S4): demanda química de oxígeno (DQO), demanda biológica de oxígeno (DBO), carbono orgánico total (TOC), nitratos (NO₃); nitritos (NO₂), fósforo reactivo soluble (PRS) y clorofila a. *Meses donde no se realizaron análisis de estos parámetros.

Se registraron valores muy elevados de DQO en los meses de enero, febrero y abril mostrando diferencias significativas con respecto a los restantes (ANOVA, $p < 0.001$) (Promedio de los cuatro sitios: 1750, 2250 y 1600 mgL⁻¹ respectivamente). No se encontraron diferencias entre los sitios estudiado (ANOVA, $p > 0.05$) (Fig. 11).

Los valores de DBO fueron superiores en los meses de septiembre (ANOVA, $p < 0.001$: sep vs ago, oct, nov y dic), febrero (ANOVA, $p < 0.001$: feb vs nov), marzo (ANOVA, $p < 0.001$: mar vs ago y nov) y abril (ANOVA, $p < 0.001$: abr vs ago, oct, nov y dic). No se encontraron diferencias

entre los sitios estudiados (ANOVA, $p > 0.05$). El valor máximo fue registrado en el sitio tres en el mes de abril (300 mgL^{-1}) (Fig. 11).

Los valores de TOC fueron superiores en el mes de marzo mostrando diferencias significativas cuando se comparan con los registrados en los meses de agosto y septiembre (ANOVA, $p < 0.0001$), alcanzando 97.19, 80.07, 58.92 y 721 mgL^{-1} en S 1, 2, 3 y 4 respectivamente. No se encontraron diferencias entre los sitios estudiados (ANOVA, $p > 0.05$) (Fig. 11).

Con respecto a los nitratos, se registraron valores muy variables entre los sitios estudiados, mostrando el S2 concentraciones mayores y significativamente diferentes con respecto a S1 y S4 (ANOVA, $p < 0.05$). En el sitio dos el valor mínimo se dió en septiembre de 2011 (0.4 mgL^{-1}) y el máximo en agosto de 2012 (15.3 mgL^{-1}). Al comparar las concentraciones registradas se obtuvieron diferencias significativas entre estos dos meses (ANOVA, $p < 0.01$) (Fig. 11).

Como se puede observar en la figura 11, sólo se tomaron registros de nitritos y PRS desde febrero hasta agosto de 2012. Con respecto a los primeros, en este período no se observaron diferencias significativas entre los meses estudiados. Si bien se registraron valores variables entre los sitios, el S2 presentó concentraciones mayores, pero no se obtuvieron diferencias significativas entre ellos (ANOVA, $p > 0.05$). El PRS se encontró en concentraciones significativamente diferentes sólo entre S1 y S2. Los menores registros fueron en el mes de junio (Promedio de los cuatro sitios: 0.11 mgL^{-1}), mostrando diferencias significativas con los restantes meses (ANOVA, $p < 0.01$), en tanto que en el mes de marzo se encontraron los valores máximos (Promedio de los cuatro sitios: 0.74 mgL^{-1}).

Los sitios uno y cuatro mostraron registros de Clorofila *a* inferiores cuando fueron comparados con el sitio dos (ANOVA, $p < 0.01$). A su vez, en la figura 11 se pueden apreciar variaciones estacionales al comparar la clorofila *a* registrada en los meses de primavera-verano con respecto a otoño-invierno (Mann-Whitney Test, $p = 0.0029$).

5.1.1.2.- Metales pesados y arsénico en agua

Los promedios anuales de Cr, Cu, Pb y As en agua correspondientes a cada sitio se muestran en la figura 12. Las comparaciones realizadas entre sitios no arrojaron diferencias significativas (ANOVA, $p > 0.05$). El Cr estuvo presente siempre en concentraciones superiores con respecto a Cu, Pb y As (ANOVA, $p < 0.001$). En S1, S2 y S3 se manifiesta el siguiente orden en cuanto a las concentraciones registradas: $\text{Cr} > \text{Pb} > \text{As} > \text{Cu}$, mientras que en S4: $\text{Cr} > \text{Cu} > \text{Pb} > \text{As}$. Como puede observarse el sitio uno presentó el promedio anual de Pb máximo ($41.4 \text{ } \mu\text{gL}^{-1}$), el sitio dos de Cr ($77.6 \text{ } \mu\text{gL}^{-1}$) y As ($20.9 \text{ } \mu\text{gL}^{-1}$), y el sitio cuatro de Cu ($28.16 \text{ } \mu\text{gL}^{-1}$).

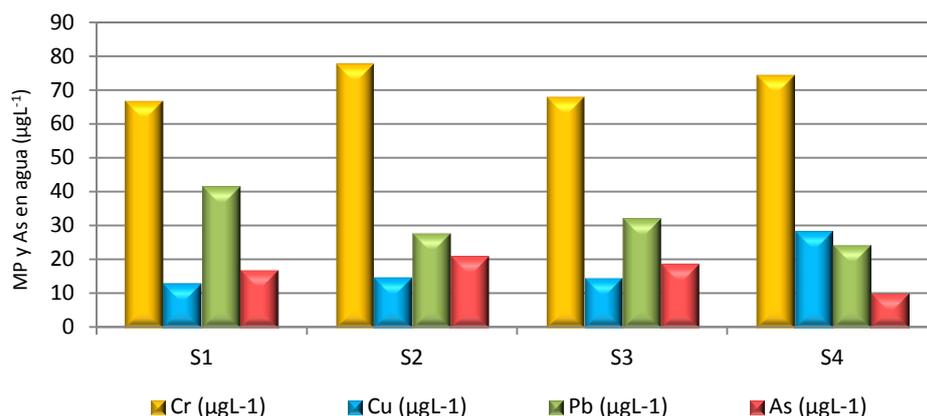


Figura N° 12: Concentraciones de Cr, Cu, Pb y As (μgL^{-1}) en agua. Los valores corresponden al promedio de 12 muestras por cada sitio (S1, S2, S3 y S4).

En los diferentes meses se registraron niveles variables de microcontaminantes inorgánicos (Cr, Cu, Pb y As) en agua. Se obtuvieron las concentraciones más altas de Cr y Pb en agosto y septiembre de 2011 con los siguientes promedios mensuales para los cuatro sitios: $343.5 (\pm 6.4) \mu\text{gL}^{-1}$ y $357.7 (\pm 5.1) \mu\text{gL}^{-1}$ de Cr; $139.45 (\pm 27.3) \mu\text{gL}^{-1}$ y $154.8 (\pm 96) \mu\text{gL}^{-1}$ de Pb. También en el mes de agosto de 2011 se registró la mayor concentración de Cu en el sitio cuatro ($230.8 \mu\text{gL}^{-1}$), mientras que la máxima concentración de As ($64.34 \mu\text{gL}^{-1}$) se registró en el sitio dos en abril de 2012 (Fig. 13).

En los sitios uno y cuatro se obtuvieron diferencias significativas entre las concentraciones de Cr, Cu, Pb y As registradas en los 12 meses de estudio (ANOVA, $p=0.0190$ y $p= 0.0036$ respectivamente). En el sitio dos no se encontraron diferencias significativas, mientras que en el sitio tres p arrojó un valor cercano al límite de significancia (ANOVA, $p= 0.1423$ y $p= 0.0701$ respectivamente).

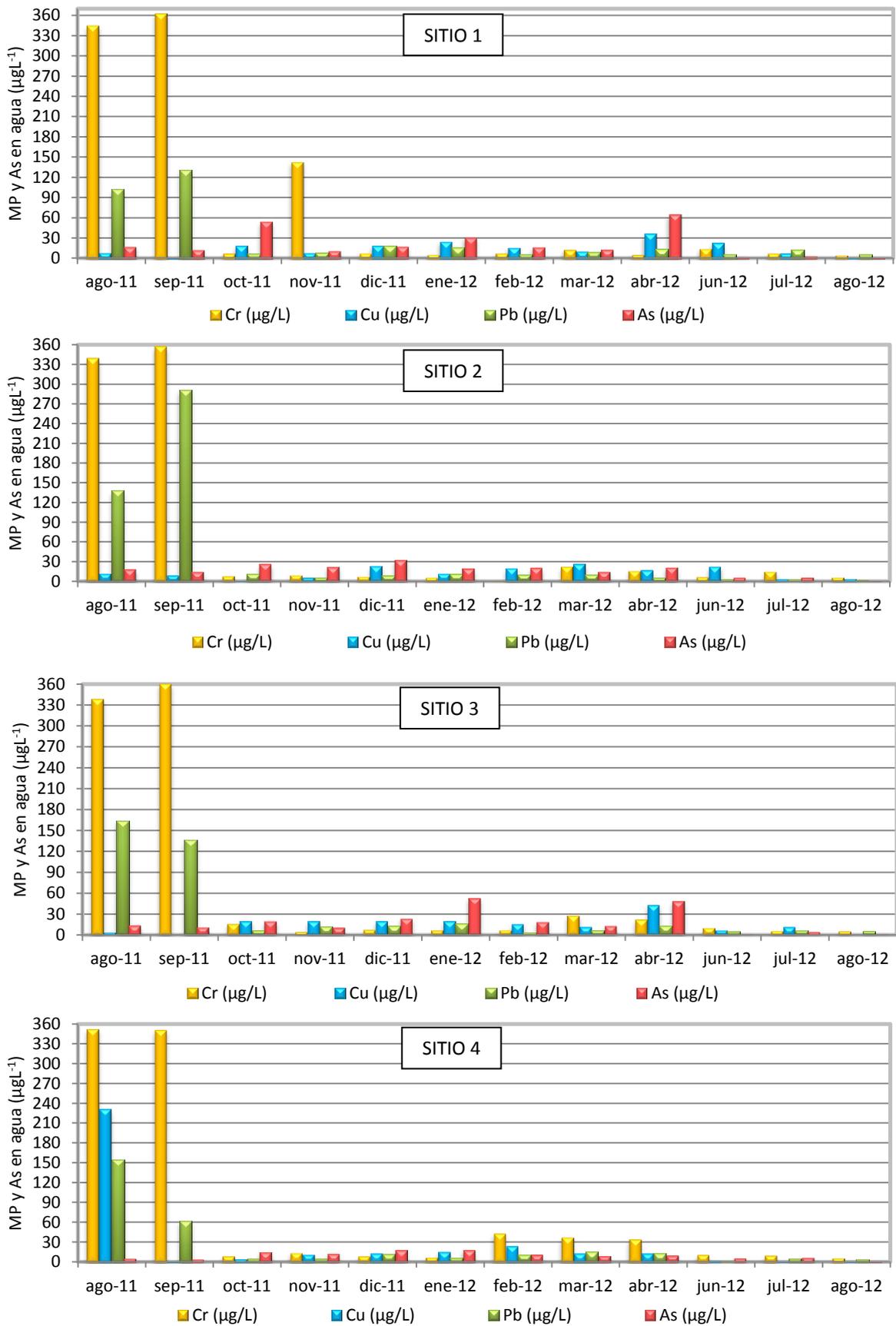


Figura Nº 13: Concentraciones de Cr, Cu, Pb y As ($\mu\text{g/L}^{-1}$) en agua en los cuatro sitios (S1, S2, S3 y S4) correspondientes a los 12 meses de muestreo.

5.1.1.3.- Metales pesados y arsénico en sedimentos

Los promedios anuales de Cr, Cu, Pb y As en sedimento correspondientes a cada sitio se muestran en la figura 14. Las comparaciones realizadas entre sitios arrojaron diferencias significativas (ANOVA, $p=0.0063$). De manera contraria a lo encontrado en agua, el Cr estuvo presente siempre en concentraciones inferiores con respecto a Cu y Pb, aunque superiores a las de As. Se encontraron diferencias extremadamente significativas cuando se compararon las concentraciones de los distintos microcontaminantes inorgánicos (ANOVA, $p<0.0001$). En todos los sitios estudiados se manifestó el mismo orden en cuanto a las concentraciones registradas: $Pb>Cu>Cr>As$. Como puede observarse el sitio uno presentó el promedio anual de Pb, Cu, Cr y As máximo (26.62; 26.07; 17.18 y 6.76 μgg^{-1} respectivamente).

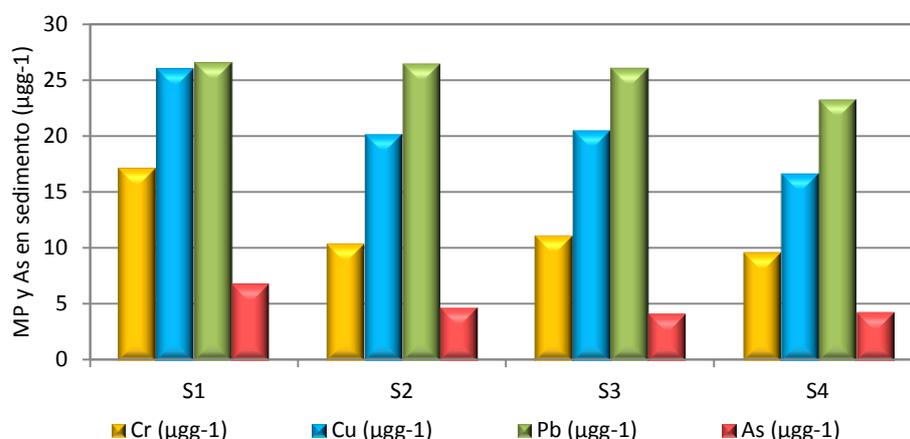


Figura Nº 14: Concentraciones de Cr, Cu, Pb y As (μgg^{-1}) en sedimento. Los valores corresponden al promedio de 12 muestras por cada sitio (S1, S2, S3 y S4).

En los diferentes meses se registraron niveles variables de metales y arsénico en sedimento (Fig. 15). Se obtuvieron las concentraciones más altas de Pb desde octubre de 2011, hasta abril de 2012, con los siguientes promedios mensuales para los cuatro sitios: 35.98 (± 8.4); 39.39 (± 9.08); 44.13 (± 3.7); 33.5 (± 9.8); 35.25 (± 8.27); 39.38 (± 2.5); 38.08 (± 6.3) μgg^{-1} , respectivamente. El valor máximo de Pb se encontró en el mes de noviembre de 2011 en el sitio dos (47.43 μgg^{-1}). De manera contraria a lo encontrado en agua, en el mes de septiembre de 2011 las concentraciones de Pb fueron bajas (6.27 (± 4) μgg^{-1}). El sedimento del sitio uno mostró tener las máximas concentraciones de Cr en agosto de 2012 (71.14 μgg^{-1}), de Cu en julio de 2012 (46.8 μgg^{-1}) y de As en abril de 2012 (31.47 μgg^{-1}). En este sitio se obtuvieron diferencias significativas cuando se compararon las concentraciones de todos los metales y el As registradas en los 12 meses (ANOVA, $p=0.0038$). También en S 2, 3 y 4 las diferencias fueron significativas (ANOVA, $p < 0.0001$).

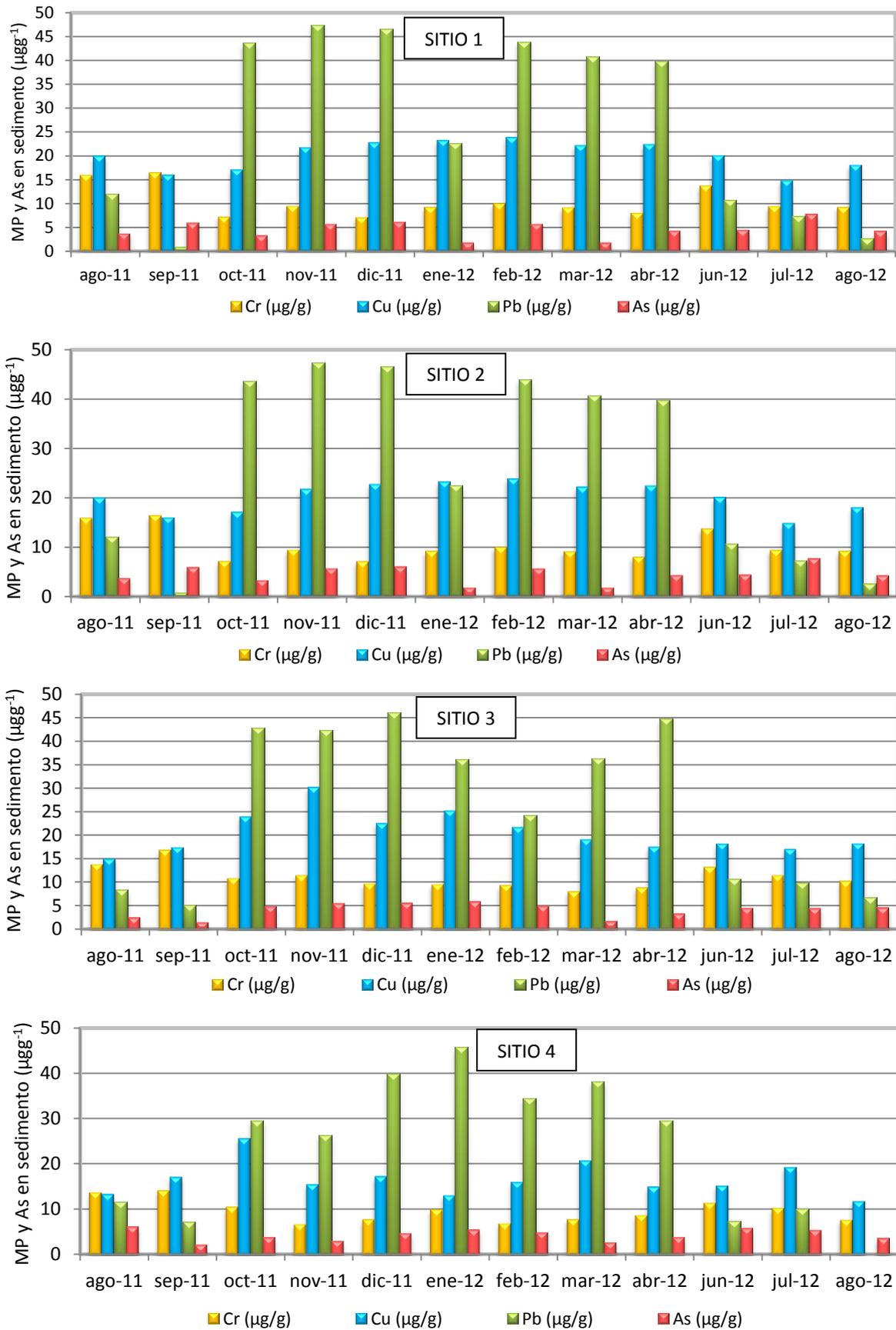


Figura N° 15: Concentraciones de Cr, Cu, Pb y As ($\mu\text{g g}^{-1}$) en sedimento en los cuatro sitios (S1, S2, S3 y S4) correspondientes a los 12 meses de muestreo.

5.1.1.4.- Plaguicidas en agua

Los promedios anuales de plaguicidas en agua (Atr, α END, β END y END. SULFATO) correspondientes a cada sitio se muestran en la figura 16. Las comparaciones realizadas entre sitios no arrojaron diferencias significativas (ANOVA, $p > 0.05$). La Atr estuvo presente siempre en concentraciones superiores con respecto al endosulfán (ANOVA, $p < 0.001$). Como puede observarse, los sitios tres y cuatro presentaron el máximo promedio anual de Atr (0.21 y 0.16 μgL^{-1} , respectivamente). Mientras que los promedios anuales de endosulfán total fueron superiores en los sitios tres y dos (0.015 y 0.014 μgL^{-1} , respectivamente), e inferiores en los sitios cuatro y uno (0.012 y 0.009 μgL^{-1} , respectivamente), con predominio de α END y β END.

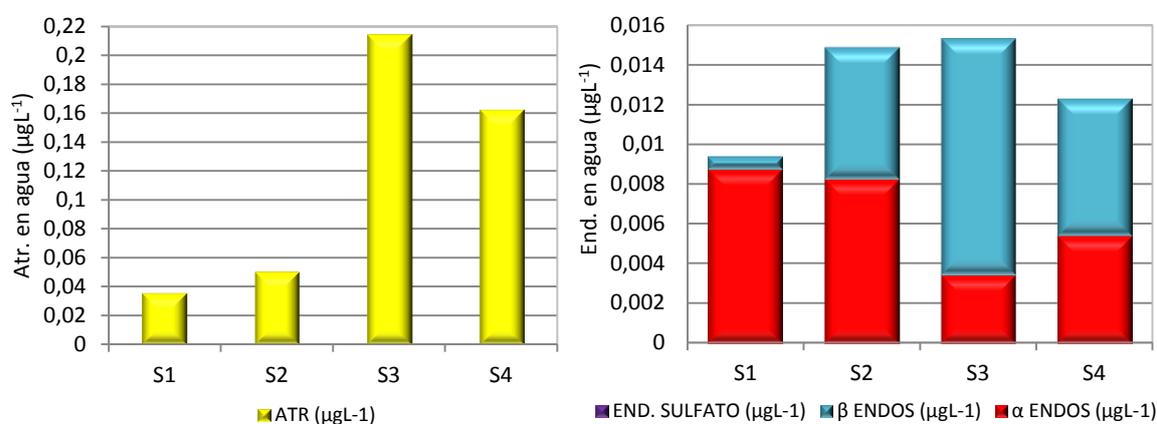


Figura N° 16: Concentraciones de Atr y End total (α END, β END y END. SULFATO) (μgL^{-1}) en agua. Los valores corresponden al promedio de 12 muestras por cada sitio (S1, S2, S3 y S4).

Los niveles de plaguicidas en agua fueron variables en los diferentes meses de muestreo (Fig. 17). En este sentido, se obtuvieron las concentraciones máximas de Atr en octubre (0,865 μgL^{-1} en S3), noviembre (1,73 μgL^{-1} en S4) y diciembre (0,135 y 0,146 μgL^{-1} en S1 y S2 respectivamente), en tanto que los niveles máximos de End total fueron registrados en diciembre (0,102 μgL^{-1} en S2), enero (0,05 μgL^{-1} en S1), junio (0,13 μgL^{-1} en S4) y agosto de 2012 (0,132 μgL^{-1} en S3). En ninguno de los sitios se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de Atr y End registradas en los distintos meses (ANOVA, $p > 0.05$).

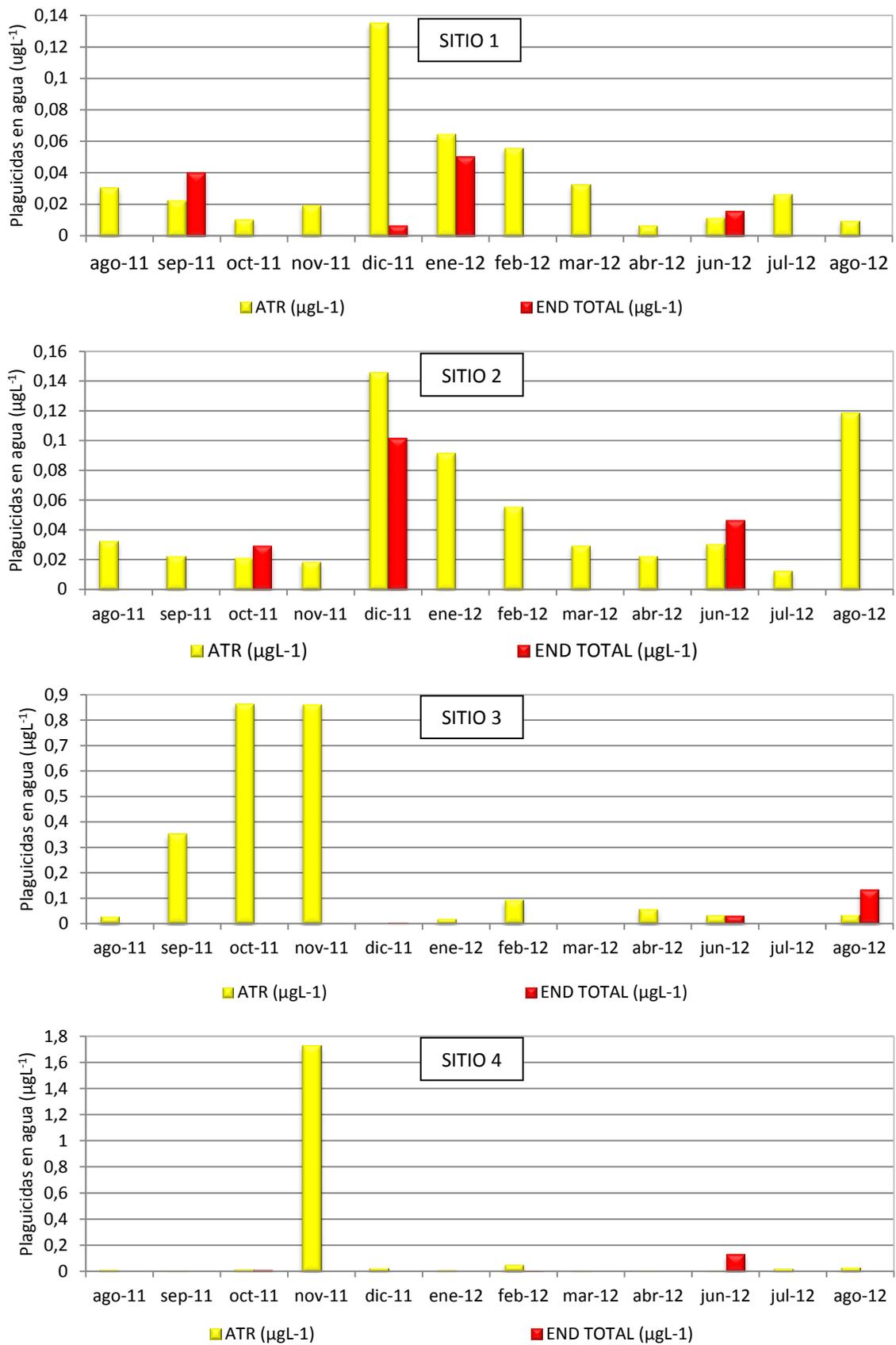


Figura Nº 17: Concentraciones Atr y End total ($\mu\text{g/L}^{-1}$) (α END, β END y END. SULFATO) en agua en cuatro sitios (S1, S2, S3 y S4) correspondientes a los 12 meses de muestreo.

5.2.- Estructura del zooplancton

5.2.1.- Riqueza de especies

La Tabla 1, muestra los organismos registrados por grupo taxonómico (Rotifera, Cladocera y Copepoda) en los cuatro sitios de muestreo durante un año. El grupo dominante fue el de los rotíferos, que estuvieron presentes en todos los sitios de muestreo, mostrando diferencia significativa con respecto a la riqueza específica de cladóceros (Paired t test, $p < 0.0001$). En este sentido se registró un total de 76 taxa de los cuales el 80,26 % correspondió a rotíferos y el 19,74 % a cladóceros.

ROTIFERA			
SITIO 1	SITIO 2	SITIO 3	SITIO 4
09-2011			
Bdelloideo sp. 1 Bdelloideo sp. 2	Bdelloideo sp. 1 Bdelloideo sp. 2 <i>Lepadella ovalis</i>	Bdelloideo sp. 1 Bdelloideo sp. 2	Bdelloideo sp. 1 Bdelloideo sp. 2
10-2011			
Bdelloideo sp. 1 Bdelloideo sp. 2	Bdelloideo sp. 1 <i>Lecane nana</i> <i>Colurella adriática</i> <i>Asplachna</i> sp.	Bdelloideo sp. 2	<i>Filinia longiseta</i> <i>Brachionus plicatilis</i> <i>Brachionus calyciflorus</i> <i>Brachionus quadridentatus</i> var 1 <i>Polyarthra</i> sp. <i>Keratella tropica</i>
11-2011			
Bdelloideo sp. 1 <i>Brachionus calyciflorus</i> <i>Brachionus plicatilis</i> <i>Asplachna</i> sp.	Bdelloideo sp. 1 <i>Brachionus calyciflorus</i> <i>Brachionus plicatilis</i> <i>Asplachna</i> sp. <i>Filinia longiseta</i> <i>Monostyla bulla</i> <i>Brachionus angularis</i> <i>Brachionus caudatus</i> var 1 <i>Brachionus caudatus</i> var 2 <i>Brachionus quadridentatus</i> var 1 <i>Brachionus quadridentatus</i> var 2 <i>Brachionus urceolaris</i> <i>Ascomorphella</i> sp. <i>Polyarthra</i> sp. <i>Lecane venusta</i> <i>Lecane papuana</i> <i>Platyas quadricornis</i> <i>Cephalodella</i> sp. <i>Trichocerca</i> sp. 1	Bdelloideo sp. 1 <i>Brachionus calyciflorus</i> <i>Brachionus plicatilis</i> <i>Asplachna</i> sp. <i>Filinia longiseta</i> <i>Monostyla bulla</i> <i>Brachionus angularis</i> <i>Brachionus caudatus</i> var 1 <i>Brachionus caudatus</i> var 2 <i>Brachionus quadridentatus</i> var 1 <i>Brachionus quadridentatus</i> var 2 <i>Brachionus urceolaris</i> <i>Polyarthra</i> sp. <i>Lecane papuana</i> <i>Platyas quadricornis</i> <i>Trichocerca</i> sp. 1 <i>Keratella tropica</i> <i>Platyonus patulus</i>	<i>Filinia longiseta</i>
12-2011			
<i>Monostyla styrax</i> <i>Brachionus urceolaris</i> <i>Platyas quadricornis</i>	Bdelloideo sp. 1 <i>Brachionus urceolaris</i> <i>Brachionus angularis</i> <i>Brachionus plicatilis</i> <i>Brachionus calyciflorus</i> <i>Brachionus rotundiformis</i> <i>Brachionus quadridentatus</i> var 1 <i>Brachionus ibericus</i> <i>Hexarthra</i> sp. <i>Colurella adriática</i> <i>Asplachna</i> sp. <i>Lepadella ovalis</i>	<i>Brachionus urceolaris</i> <i>Brachionus angularis</i> <i>Brachionus plicatilis</i> <i>Brachionus calyciflorus</i> <i>Brachionus rotundiformis</i> <i>Brachionus ibericus</i> <i>Hexarthra</i> sp. <i>Colurella adriática</i>	<i>Brachionus urceolaris</i> <i>Brachionus angularis</i> <i>Brachionus plicatilis</i> <i>Brachionus calyciflorus</i> <i>Brachionus rotundiformis</i> <i>Brachionus quadridentatus</i> var 1 <i>Brachionus ibericus</i> <i>Brachionus caudatus</i> var 1 <i>Trichocerca</i> sp. 1
01-2012			
<i>Brachionus angularis</i> <i>Brachionus plicatilis</i> <i>Brachionus urceolaris</i> <i>Brachionus calyciflorus</i>	Bdelloideo sp. 2 <i>Brachionus angularis</i> <i>Brachionus plicatilis</i> <i>Brachionus urceolaris</i>	Bdelloideo sp. 1 <i>Brachionus plicatilis</i> <i>Brachionus urceolaris</i> <i>Brachionus ibericus</i> <i>Brachionus rotundiformis</i> <i>Hexarthra</i> sp.	<i>Brachionus angularis</i> <i>Brachionus plicatilis</i> <i>Brachionus urceolaris</i> <i>Brachionus caudatus</i> var 1

		<i>Asplachna</i> sp. <i>Monostyla styrax</i>	
02-2012			
<i>Bdelloideo</i> sp. 2 <i>Monostyla styrax</i> <i>Brachionus plicatilis</i> <i>Brachionus urceolaris</i> <i>Hexarthra</i> sp.	<i>Bdelloideo</i> sp. 1 <i>Bdelloideo</i> sp. 2 <i>Brachionus plicatilis</i> <i>Brachionus urceolaris</i> <i>Filinia longiseta</i> <i>Brachionus calyciflorus</i> <i>Brachionus angularis</i> <i>Polyarthra</i> sp.	<i>Bdelloideo</i> sp. 1 <i>Bdelloideo</i> sp. 2 <i>Brachionus plicatilis</i> <i>Brachionus urceolaris</i> <i>Filinia longiseta</i> <i>Brachionus calyciflorus</i> <i>Brachionus angularis</i> <i>Polyarthra</i> sp. <i>Filinia saltator</i> <i>Hexarthra</i> sp. <i>Trichocerca</i> sp. 1 <i>Cephalodella</i> sp.	<i>Bdelloideo</i> sp. 1 <i>Bdelloideo</i> sp. 2 <i>Monostyla styrax</i> <i>Brachionus plicatilis</i> <i>Brachionus urceolaris</i> <i>Filinia longiseta</i> <i>Brachionus caudatus</i> var 2 <i>Polyarthra</i> sp. <i>Monostyla bulla</i> <i>Brachionus quadridentatus</i> var 2 <i>Platyonus patulus</i> <i>Platyas quadricornis</i> <i>Lecane papuana</i> <i>Lecane elsa</i> <i>Lecane luna</i> <i>Lecane leontina</i> <i>Lecane hastata</i> <i>Hexarthra</i> sp. <i>Trichocerca</i> sp. 1 <i>Asplachna</i> sp. <i>Lepadella romboides</i> <i>Lepadella ovalis</i> <i>Colurella adriatica</i>
03-2012			
<i>Bdelloideo</i> sp. 1 <i>Filinia longiseta</i> <i>Polyarthra</i> sp. <i>Colurella colurus</i> <i>Colurella adriatica</i> <i>Monostyla bulla</i> <i>Trichocerca</i> sp. 1 <i>Lepadella elliptica</i> <i>Platyas quadricornis</i> <i>Hexarthra</i> sp. <i>Cephalodella</i> sp. <i>Euchlanis triquetra</i> <i>Monommata maculata</i> <i>Lecane papuana</i>	<i>Bdelloideo</i> sp. 1 <i>Trichocerca</i> sp. 1 <i>Cephalodella</i> sp. <i>Brachionus plicatilis</i> <i>Brachionus urceolaris</i> <i>Brachionus mirabilis</i> <i>Platyonus patulus</i> <i>Lecane papuana</i> <i>Lecane hastata</i> <i>Lecane luna</i> <i>Dicranophorus</i> sp.	<i>Bdelloideo</i> sp. 1 <i>Filinia longiseta</i> <i>Polyarthra</i> sp. <i>Colurella colurus</i> <i>Colurella adriatica</i> <i>Monostyla bulla</i> <i>Trichocerca</i> sp. 1 <i>Trichocerca</i> sp. 2 <i>Platyas quadricornis</i> <i>Cephalodella</i> sp. <i>Brachionus plicatilis</i> <i>Brachionus urceolaris</i> <i>Brachionus quadridentatus</i> var 1 <i>Brachionus caudatus</i> var 1 <i>Brachionus caudatus</i> var 2 <i>Brachionus calyciflorus</i> <i>Brachionus angularis</i> <i>Platyonus patulus</i> <i>Lecane papuana</i> <i>Lecane leontina</i> <i>Asplachna</i> sp. <i>Keratella tropica</i> <i>Mytilina mucronata</i>	<i>Bdelloideo</i> sp. 1 <i>Polyarthra</i> sp. <i>Monostyla bulla</i> <i>Monostyla pyriformis</i> <i>Monostyla lunaris</i> <i>Monostyla unguitata</i> <i>Monostyla sinuata</i> <i>Trichocerca</i> sp. 1 <i>Trichocerca</i> sp. 2 <i>Trichocerca</i> sp. 3 <i>Platyas quadricornis</i> <i>Cephalodella</i> sp. <i>Euchlanis triquetra</i> <i>Euchlanis dilatata</i> <i>Monommata maculata</i> <i>Lecane papuana</i> <i>Lecane hastata</i> <i>Lecane luna</i> <i>Lecane leontina</i> <i>Lecane elsa</i> <i>Lecane curvicornis</i> <i>Asplachna</i> sp. <i>Mytilina mucronata</i> <i>Scaridium longicaudum</i> <i>Trichotria longipedis</i> <i>Testudinella</i> sp.
04-2012			
	<i>Bdelloideo</i> sp. 1 <i>Brachionus urceolaris</i> <i>Brachionus plicatilis</i> <i>Colurella adriatica</i>	<i>Brachionus urceolaris</i> <i>Brachionus angularis</i> <i>Trichocerca</i> sp.1	<i>Brachionus plicatilis</i> <i>Brachionus calyciflorus</i> <i>Brachionus caudatus</i> var 2 <i>Colurella adriatica</i> <i>Trichocerca</i> sp.1 <i>Hexarthra</i> sp. <i>Keratella tropica</i> <i>Polyarthra</i> sp. <i>Filinia longiseta</i> <i>Anuraeopsis fissa donghuensis</i> <i>Anuraeopsis fissa urawensis</i> <i>Lecane papuana</i> <i>Testudinella</i> sp. <i>Lecane hastata</i>
06-2012			
<i>Bdelloideo</i> sp. 1 <i>Notholca acuminata</i>	<i>Bdelloideo</i> sp. 1 <i>Bdelloideo</i> sp. 2 <i>Brachionus plicatilis</i>	<i>Bdelloideo</i> sp. 1 <i>Bdelloideo</i> sp. 2 <i>Notholca acuminata</i> <i>Brachionus caudatus</i> var 2	<i>Keratella tropica</i> <i>Monostyla unguitata</i> <i>Lecane elsa</i>

		<i>Brachionus angularis</i> <i>Trichocerca</i> sp.1 <i>Hexarthra</i> sp. <i>Keratella tropica</i> <i>Ascomorpha</i> sp. <i>Anuraeopsis fissa urawensis</i> <i>Euchlanis triquetra</i> <i>Colurella adriática</i> <i>Monostyla pyriformis</i>	
07-2012			
Bdelloideo sp. 1 Bdelloideo sp. 2 <i>Notholca acuminata</i> <i>Colurella adriática</i> <i>Monostyla pyriformis</i> <i>Trichocerca</i> sp. 1	Bdelloideo sp. 1 Bdelloideo sp. 2 <i>Notholca acuminata</i> <i>Notholca squamula</i> <i>Colurella adriática</i> <i>Monostyla pyriformis</i> <i>Lepadella ovalis</i> <i>Brachionus plicatilis</i> <i>Asplachnopus</i> sp.	Bdelloideo sp. 1 <i>Notholca squamula</i> <i>Lepadella ovalis</i> <i>Brachionus plicatilis</i> <i>Asplachnopus</i> sp. <i>Testudinella</i> sp.	<i>Notholca acuminata</i> <i>Notholca labis</i> <i>Trichocerca</i> sp. 1 <i>Trichocerca</i> sp. 2 <i>Asplachnopus</i> sp. <i>Asplachna</i> sp. <i>Polyarthra</i> sp. <i>Keratella tropica</i>
08-2012			
Bdelloideo sp. 1 <i>Notholca acuminata</i> <i>Notholca squamula</i> <i>Colurella adriática</i> <i>Testudinella</i> sp.	Bdelloideo sp. 2 <i>Notholca squamula</i> <i>Colurella adriática</i> <i>Colurella colurus</i> <i>Lepadella ovalis</i> <i>Cephalodella</i> sp. <i>Brachionus plicatilis</i> <i>Asplachnopus</i> sp.	Bdelloideo sp. 2 <i>Notholca squamula</i> <i>Colurella adriática</i> <i>Colurella colurus</i> <i>Colurella colurus</i> <i>Lepadella ovalis</i> <i>Cephalodella</i> sp. <i>Asplachnopus</i> sp.	<i>Notholca labis</i> <i>Testudinella</i> sp. <i>Cephalodella</i> sp. <i>Asplachnopus</i> sp. <i>Polyarthra</i> sp. <i>Keratella tropica</i> <i>Brachionus quadridentatus</i> var 2 <i>Monostyla hamata</i> <i>Monostyla unguitata</i> <i>Asplachna</i> sp. <i>Trichocerca</i> sp. 1 <i>Mytilina mucronata</i> <i>Platyonus patulus</i>
CLADOCERA			
SITIO 1	SITIO 2	SITIO 3	SITIO 4
08-2011			
			<i>Moina micrura</i>
09-2011			
			<i>Macrotrix goeldi</i>
10-2011			
			<i>Macrotrix goeldi</i>
11-2011			
	<i>Moina minuta</i> <i>Moina micrura</i> <i>Moina reticulata</i> <i>Moina hutchinsoni</i> <i>Daphnia spinulata</i>	<i>Moina minuta</i> <i>Moina micrura</i> <i>Moina reticulata</i>	<i>Moina minuta</i> <i>Moina micrura</i> <i>Moina reticulata</i> <i>Diaphanosoma fluviatile</i>
12-2011			
			<i>Moina reticulata</i>
01-2012			
			<i>Moina micrura</i> <i>Moina reticulata</i>
02-2012			
	<i>Moina micrura</i> <i>Moina reticulata</i>	<i>Diaphanosoma fluviatile</i>	<i>Moina micrura</i> <i>Moina reticulata</i> <i>Moina minuta</i> <i>Pleuroxus similis</i> <i>Macrotrix goeldi</i> <i>Guernella raphaelis</i> <i>Kurzia latissima</i> <i>Leydigioopsis curvirostris</i>
03-2012			
<i>Moina micrura</i>	<i>Moina minuta</i>	<i>Moina micrura</i> <i>Moina minuta</i>	<i>Moina micrura</i> <i>Moina minuta</i>

		<i>Moina reticulata</i> <i>Ceriodaphnia dubia</i>	<i>Moina reticulata</i> <i>Ceriodaphnia dubia</i> <i>Echinisca elegans</i> <i>Simocephalus</i> sp. <i>Diaphanosoma fluviatile</i>
04-2012			
		<i>Moina micrura</i>	<i>Moina micrura</i> <i>Moina reticulata</i>
06-2012			
<i>Moina micrura</i>			
07-2012			
	<i>Alona</i> sp. <i>Diaphanosoma fluviatilis</i>		
08-2012			
	<i>Moina reticulata</i> <i>Leydigiopsis curvirostris</i> <i>Alona</i> sp.	<i>Alona</i> sp.	<i>Alona</i> sp.
COPEPODA			
SITIO 1	SITIO 2	SITIO 3	SITIO 4
08-2011			
	Cyclopoida Harpacticoida	Harpacticoida	Cyclopoida Harpacticoida
09-2011			
Cyclopoida Harpacticoida Nauplios	Cyclopoida Nauplios	Harpacticoida Copepoditos	Harpacticoida Copepoditos Nauplios
10-2011			
Cyclopoida Harpacticoida Copepoditos Nauplios	Copepoditos Nauplios		Cyclopoida Harpacticoida Copepoditos Nauplios
11-2011			
	Cyclopoida Harpacticoida	Cyclopoida Nauplios	Cyclopoida Harpacticoida Copepoditos Nauplios
12-2011			
Cyclopoida Harpacticoida Copepoditos Nauplios	Cyclopoida Nauplios	Cyclopoida Harpacticoida Copepoditos Nauplios	Cyclopoida Copepoditos Nauplios
01-2012			
Harpacticoida Nauplios		Harpacticoida Nauplios	Cyclopoida Calanioda Copepoditos Nauplios
02-2012			
Cyclopoida Copepoditos Nauplios	Cyclopoida	Cyclopoida Calanioda Harpacticoida Nauplios	Cyclopoida Nauplios
03-2012			
Copepoditos Nauplios	Cyclopoida Harpacticoida	Cyclopoida Harpacticoida Nauplios	Cyclopoida Nauplios
04-2012			
Harpacticoida	Cyclopoida Harpacticoida Copepoditos	Cyclopoida Harpacticoida	Cyclopoida Copepoditos Nauplios
06-2012			
Harpacticoida Nauplios		Cyclopoida Nauplios	Nauplios

07-2012			
Harpacticoida Nauplios	Nauplios	Harpacticoida Nauplios	Cyclopoida Nauplios
08-2012			
Cyclopoida Harpacticoida Nauplios	Cyclopoida Harpacticoida Copepoditos Nauplios	Harpacticoida Copepoditos Nauplios	Copepoditos Nauplios

Tabla 1: Riqueza de especies por grupo taxonómico (Rotifera, Cladocera y Copepoda) registrados en los cuatro sitios de muestreo durante un año (agosto de 2011-agosto de 2012).

En S1 se registró un total de 25 taxa de rotíferos y 1 de cladóceros; 36 y 8 en S2; 41 y 9 en S3, y 51 y 13 especies en S4 respectivamente. Por lo tanto la riqueza de especies disminuyó entre sitios de muestreo en el siguiente orden: S4>S3>S2>S1 (Fig. 18), siendo significativamente diferente entre los sitios uno y cuatro (ANOVA, $p<0.01$).

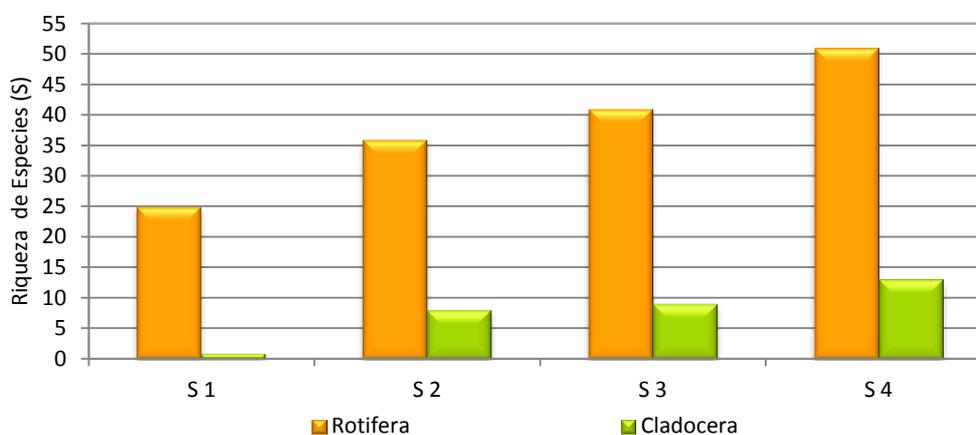


Figura Nº 18: Riqueza de especies de rotíferos y cladóceros en cada sitio estudiado (S1, S2, S3 y S4) durante un año de muestreo.

Los géneros de rotíferos mejor representados por la numerosidad de especies fueron *Brachionus* (11 especies), *Lecane* (8 especies) y *Monostyla* (7 especies). Los taxa de Monogonontha con mayor frecuencia de aparición durante todo el muestreo fueron: *Brachionus plicatilis* (23 veces), *Brachionus urceolaris* (18 veces), *Trichocerca* sp. 1 (15 veces), *Colurella adriatica* (14 veces), *Brachionus angularis* (13 veces), *Polyarthra* sp. (12 veces), *Asplachna* sp., *Brachionus calyciflorus*, *Filinia longiseta*, *Cephalodella* sp. y *Hexarthra* sp. (9 veces).

En cuanto a la frecuencia de aparición de diferentes taxa de rotíferos y cladóceros a lo largo del año podemos mostrar el siguiente orden decreciente: S4 (108 veces) > S3 (102 veces) > S2 (86 veces) > S1 (47 veces), y S4 (27 veces) > S2 (12 veces) > S3 (9 veces) > S1 (2 veces), respectivamente.

En el S1 estuvo representado el 40.98 % del total de las especies registradas de rotíferos. Los taxa con mayor frecuencia de aparición durante el estudio anual correspondieron a la

Subclase Bdelloidea, siguiendo en orden decreciente *Brachionus* (*B. plicatilis* y *B. urceolaris*), *C. adriática* y *Notholca acuminata* (esta última registrada en los meses de invierno).

En el S2 estuvo representado el 59.01 % del total de las especies de rotíferos registradas. Los taxa con mayor frecuencia de aparición correspondieron a la Subclase Bdelloidea y a la especie *B. plicatilis*, siguiendo en orden decreciente por *B. urceolaris*, *C. adriática*, *B. angularis* y *Lepadella ovalis*.

En el S3 estuvo representado el 67.21 % del total de las especies registradas. Los taxa predominantes correspondieron a la Subclase Bdelloidea, siguiendo en orden decreciente *B. plicatilis*, *B. urceolaris* y *B. angularis* (en igual número), *Trichocerca* sp. 1, *B. calyciflorus*, *C. adriática* y *Hexarthra* sp.

En el S4 estuvo representado el 83.6 % del total de las especies encontradas. Los taxa con mayor frecuencia de aparición correspondieron a *Polyarthra* sp., *Trichocerca* sp. 1, *F. longiseta*, *Keratella tropica* y *B. plicatilis*. Cabe destacar que en tres de los sitios estudiados se observaron algunas especies exclusivas de estos ambientes. Tal es el caso de: *Anuraeopsis fissa donghuensis*, *Euchlanis dilatata*, dos especies del género *Lecane* (*L. curvicornis* y *L. elsa*), *Lepadella romboides*, tres especies del género *Monostyla* (*M. hamata*, *M. lunaris* y *M. sinuata*), *Notholca labis*, *Scardium longicaudum*, *Trichotria longipedis* y *Trichocerca* sp. 3, representadas sólo en S4. Mientras que sólo en el sitio tres se encontró *Filinia saltator*, y en el sitio dos *Ascomorphella* sp., *Brachionus mirabilis*, *Dicranophorus* sp. y *Lecane venusta* con una frecuencia menor.

Con respecto al grupo de los cladóceros, el único género mejor representado por su número de especies fue *Moina*, con cuatro especies. A su vez, los Moinidos fueron los que presentaron mayor frecuencia de aparición durante todo el muestreo: *Moina reticulata* (11 veces), *Moina micrura* (10 veces), *Moina minuta* (8 veces). Menos frecuentes fue *Diaphanosoma fluviatile* (4 veces), *Macrotrix goeldi* y *Alona* sp. (3 veces).

En el S1 se registró sólo una especie durante todo el muestreo (*Moina micrura*), representado el 6.6 % del total de las especies registradas. La misma fue encontrada solamente en dos oportunidades (marzo y junio de 2012).

En S 2, 3 y 4 estuvo representado el 53.33 %, 60 % y 86.6 % respectivamente del total de las especies registradas. Cabe mencionar que especies como *Daphnia spinulata* y *Moina hutchinsoni* mostraron exclusividad por el sitio dos, mientras que un número mayor de especies fueron registradas únicamente en el sitio cuatro: *Echinisca elegans*, *Guernella raphaelis*, *Kurzia latissima*, *Macrotrix goeldi*, *Pleuroxus similis* y el género *Simocephalus* sp.

La riqueza específica de cladóceros y rotíferos fue variable en los diferentes meses ($p < 0.0001$) (Fig. 19). Los valores mínimos fueron registrados en agosto y septiembre de 2011, mientras que los máximos se obtuvieron en los meses de febrero y marzo de 2012, mostrando diferencia significativa entre los mismos (ANOVA, $p < 0.05$). El único mes donde no se

encontraron rotíferos fue agosto de 2011, mientras que en septiembre de 2011 sólo se registraron rotíferos Bdelloideos y *Lepadella ovalis*. No se encontraron diferencias significativas cuando se establecieron comparaciones entre la riqueza de especies registrada en las cuatro estaciones (Paired t test, $p = 0.219$).

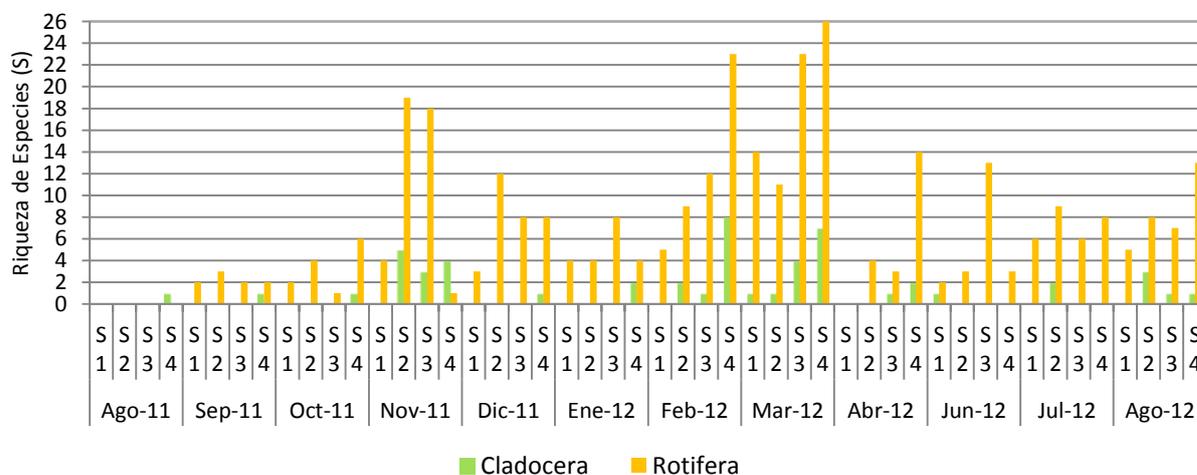


Figura N° 19: Riqueza de especies de cladóceros y rotíferos registradas en cada sitio (S1, S2, S3 y S4) durante los 12 meses de muestreo.

Con respecto a la frecuencia de aparición de los tres órdenes de copépodos (Fig. 20), en los sitios uno y tres se encontraron mayormente Harpacticoideos, mientras que en los sitios dos y cuatro fueron mas frecuentes los copépodos Cyclopoideos. Sólo en los sitios tres y cuatro se registraron copépodos calaniodeos en los meses de febrero y enero de 2012 respectivamente. Se determinaron diferencias significativas en la frecuencia de aparición de Harpacticoideos y Cyclopoideos con respecto a Calanoideos (ANOVA, $p < 0.05$). También en el sitio cuatro se registraron con mayor frecuencia copepoditos y nauplios. No se encontraron diferencias significativas cuando se comparó la frecuencia de aparición entre los cuatro sitios (ANOVA, $p = 0.4507$), tampoco cuando se establecieron comparaciones entre los diferentes meses (ANOVA, $p = 0.2156$).

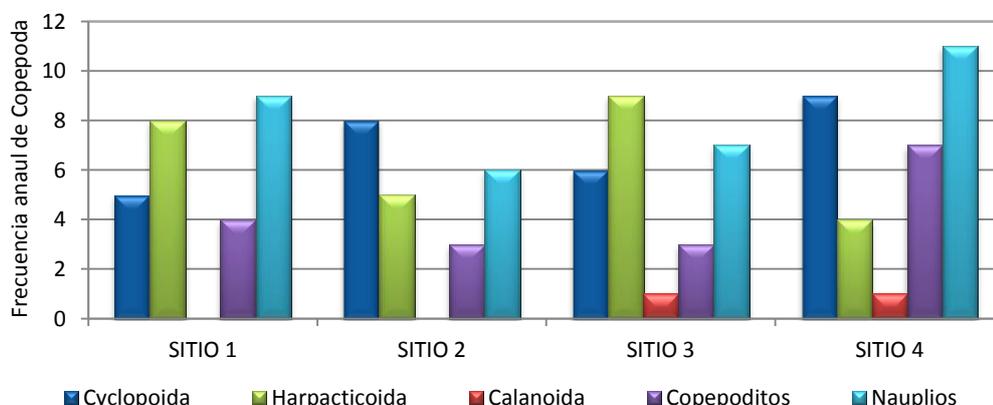


Figura N° 20: Frecuencia de aparición de copépodos Cyclopoideos, Harpacticoideos, Calanoideos, copepoditos y nauplios (N° de registros durante un año de muestreo) mostrado por cada uno de los sitios estudiados (S1, S2, S3 y S4).

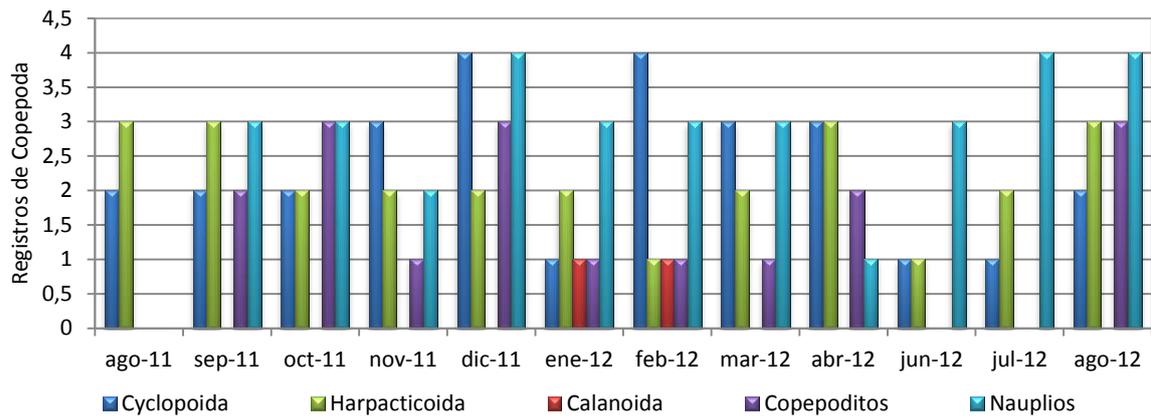


Figura Nº 21: Frecuencia de aparición de copéodos Cyclopoideos, Harpacticoideos, Calanoideos, copepoditos y nauplios registrados en cada uno de los meses estudiados.

6.- DISCUSIÓN PARCIAL

Los desequilibrios ocasionados por la incorporación de plaguicidas y metales pesados en los sistemas acuáticos continentales vienen impulsando desde hace décadas la necesidad de investigar y ejecutar estudios ecotoxicológicos que evalúen efectos directos e indirectos sobre organismos indicadores. En nuestro país, pese al impacto ecológico generado por la actividad industrial y agrícola, son escasos los trabajos de monitoreo ambiental que registren y comparen aspectos físicoquímicos y biológicos, estableciendo relaciones con contaminantes orgánicos e inorgánicos, productos de dichas actividades.

Este trabajo es un aporte que no sólo muestra las relaciones existentes entre variables ambientales con cambios en componentes de la comunidad zooplanctónica, sino que también da a conocer un registro taxonómico de rotíferos y cladóceros presentes en arroyos nunca antes relevados. Si bien, a nivel regional se han realizado investigaciones que relacionan la diversidad de esta comunidad con variables determinantes de la calidad del agua (Gagneten y Ceresoli, 2004; Gagneten y Paggi, 2009; José de Paggi y Devercelli, 2011; entre otros) no se encontraron aquellos que evalúen en campo los efectos de plaguicidas como la atrazina y el endosulfán sobre dicha comunidad, tampoco de metaloides importantes a nivel regional, generalmente de origen natural, como por ejemplo el arsénico.

A continuación se hace referencia a los cambios espaciales y temporales que se fueron observando a lo largo del año en el área de estudio, teniendo en cuenta los parámetros físicoquímicos registrados *in situ* y laboratorio, las concentraciones de metales pesados, arsénico y plaguicidas, considerando su relación con los estándares argentino y canadiense (Tabla 2), y los parámetros biológicos estudiados.

En función del grado de mineralización de sus aguas, los sistemas acuáticos estudiados fueron caracterizados como ambientes hiposalinos (con rangos de conductividad que oscilan entre $3 \mu\text{S cm}^{-1}$ y $20000 \mu\text{S cm}^{-1}$) (Montes y Martino, 1987; Cirujano, 1990 y 1995), empleando a la conductividad como parámetro de aproximación. Aunque, según Margalef (1983), existen variaciones en la relación entre la conductividad y la salinidad dependiendo de los iones que dominan la solución.

En el A° Corralito y en el primer tramo estudiado del A° Colastiné (S2 y S3), la conductividad alcanzó en el mes de septiembre valores máximos: 18240 y $17330 \mu\text{S cm}^{-1}$. Promedios anuales inferiores se obtuvieron en el canal Santa María (S1) y en el tramo del A° Colastiné cercano a la desembocadura con el Río Coronda (S4): $8576.2 \mu\text{S cm}^{-1}$ y $3541.6 \mu\text{S cm}^{-1}$, respectivamente (Fig. 8). Este parámetro mostró una relación lineal positiva y extremadamente significativa con la concentración de sólidos totales suspendidos (STS) ($r = 0.6637$; $p < 0.0001$), variable a veces empleada como medida indirecta de la salinidad del agua, también denominada sólidos totales disueltos (STD). Por lo tanto, también las concentraciones

más altas de STS se registraron en el A° Corralito y en el primer tramo A° Colastiné (S2 y S3), con un promedio anual de 11.88 (± 0.88) y 11.05 (± 1.9) gL^{-1} , mientras que en el canal Santa María y en el tramo correspondiente al sitio 4 del A° Colastiné los promedios fueron inferiores: 6.52 (± 0.53) y 3.23 (± 1.37) gL^{-1} (Fig. 8). A su vez, las variaciones de conductividad demostraron una relación inversa significativa con las precipitaciones mensuales ($r = -0.68$; $p = 0.01$).

El pH del agua está determinado por las sales disueltas y por los procesos físico-químicos y biológicos que tienen lugar en el medio acuático (Margalef, 1983). El ambiente estudiado se caracterizó por presentar aguas alcalinas, con los siguientes promedios anuales de pH: 8.25 (± 0.4), 8.04 (± 0.5), 8.01 (± 0.5) y 8.16 (± 0.6), para los sitios 1, 2, 3 y 4, respectivamente (Fig. 8).

Si bien en las aguas salobres hay ciertas especies de zooplancton adaptadas a vivir en concentraciones intermedias de salinidad, no se conoce ninguna confinada a este tipo de ambiente (Margalef, 1983). En este sentido, varios de los taxa registrados en este trabajo son considerados característicos de lagos y lagunas salinas, con rangos de pH que oscilan entre 8.3 y 8.8, como por ejemplo *Brachionus plicatilis*, *Hexarthra*, *Notholca*, copépodos Harpacticoides, Moinidos, *Macrothrix*, algunas *Alonas* y Daphnidos (Margalef, 1983).

En el presente trabajo se registraron numerosas especies de ambientes salinos. Coincidiendo con José de Paggi y Devercelli (2011), que estudiaron la diversidad del microzooplancton correspondiente a cuencas ubicadas en zonas rurales de la provincia de Santa Fe que presentaron rangos de conductividad entre 2530 y 4810 $\mu\text{S cm}^{-1}$. Las mencionadas autoras encontraron predominio de especies como *Brachionus plicatilis*, *Brachionus angularis*, *Brachionus ibericus* y *Keratella tropica*. En el presente trabajo además de observar esos mismos taxa, se registraron otras especies que otros autores (Koste y Shiel, 1989; 1990) también caracterizan como propias de ambientes salobres: *Colurella adriatica* (pH 5.5-10.5; cond. 57-13940 $\mu\text{S cm}^{-1}$), *Lepadella ovalis* (pH 5.8-7.7; cond. 273-3330 $\mu\text{S cm}^{-1}$), *Filinia saltator* (pH 8.0-8.8; cond. 1200-3000 $\mu\text{S cm}^{-1}$) y *Lecane luna* (pH 4.6-8.4; cond. 37-3330 $\mu\text{S cm}^{-1}$).

Otro factor que puede afectar la calidad del agua es el input de materia orgánica aportada por efluentes que provienen de lecherías y fábricas de productos de cuero. En estas condiciones, es muy frecuente la aparición de organismos tolerantes, tales como los rotíferos bdelloideos. En este trabajo cuando el DQO presentó valores promedios anuales muy elevados con rangos entre 623,4 y 835,4 mgL^{-1} dominaron los rotíferos Bdelloideos. El DBO fue superior en los sitios 3 y 2 (99.8 y 95.7 mgL^{-1} , respectivamente) y levemente inferior en los sitios 1 y 4 (74.5 y 60.9 mgL^{-1} , respectivamente), correspondiendo a ambientes polisaprobios según Margalef (1983). Esta situación fue coincidente con lo analizado en estudios previos en la cuenca del río Salado inferior (Gagneten y Ceresoli, 2004; Gagneten y Paggi, 2009), aunque en este trabajo los registros de DQO y DBO fueron superiores.

Las concentraciones de metales pesados registradas en agua y sedimento fueron superiores a las halladas en el tramo inferior del río Salado (Gagneten y col., 2007; Gagneten y Paggi 2009; José de Paggi y Devercelli, 2011). Gallo y col. (2006), encontraron grandes variaciones en la concentración promedio de Cr: valores $<10 \mu\text{gL}^{-1}$ y $30 \mu\text{gL}^{-1}$ fueron observados en el arroyo Cululú y entre $18,8 \mu\text{gL}^{-1}$ y $12,1 \mu\text{gL}^{-1}$ en el río Salado, con valores máximos de $4573 \mu\text{gL}^{-1}$ cerca de la ciudad de Esperanza. Según los resultados obtenidos en el presente trabajo, el Cr en agua estuvo presente siempre en concentraciones superiores con respecto a los demás metales, superando los niveles guías propuestos para la protección de la biota acuática (Tabla 2: NG Arg. $\leq 2.5 \mu\text{gL}^{-1}$). El Canal Santa María presentó el promedio anual de Pb máximo en agua ($41.4 \mu\text{gL}^{-1}$), el A° Corralito de Cr ($77.6 \mu\text{gL}^{-1}$) y As ($20.9 \mu\text{gL}^{-1}$), y el A° Colastiné (S4) de Cu ($28.16 \mu\text{gL}^{-1}$) (Fig. 12; Tabla 3).

AGUA	Metales Pesados y As				Atrazina	
	Cr	Cu	Pb	As	Atr	End
Nivel guía argentino (μgL^{-1})	2.5*	6.6**	1.59	15	3	0.007
Nivel guía canadiense (μgL^{-1})	1 - 8.9***	2-4	1-7	5	1.8	0.003
SEDIMENTO	Cr	Cu	Pb	As	Atr	End
Nivel guía argentino (μgg^{-1})	s.d.	s.d.	s.d.	s.d.	s.d.	s.d.
Nivel guía canadiense (μgg^{-1})	37.3	35.7	35	5.9	s.d.	s.d.

Tabla 2: Niveles guía de calidad de agua y sedimento para la protección de la biota acuática (aplicable a agua dulce) propuestos por la Subsecretaría de Recursos Hídricos de la República Argentina (2003 a y b, 2004 a y b y 2005 a y b) y la Canadian Environmental Quality Guidelines (2003). *Si se determina sólo la concentración de Cr total (Cr^{+6} y Cr^{+3}) el nivel guía de aplicación es el derivado para Cr^{+6} . ** Valor de dureza a la que se ajustan los datos: 100CaCO_3 (mgL^{-1}). *** $1 \mu\text{gL}^{-1}$ para Cr^{+6} y $8.9 \mu\text{gL}^{-1}$ para Cr^{+3} .

De manera contraria a lo encontrado en agua, en sedimento el Cr estuvo presente siempre en concentraciones inferiores con respecto a Cu y Pb, aunque superiores a las de As. En todos los sitios estudiados se manifestó el siguiente orden: $\text{Pb} > \text{Cu} > \text{Cr} > \text{As}$, presentando el canal Santa María (S1) el promedio anual de Pb, Cu, Cr y As máximo ($26.6 \mu\text{gg}^{-1}$; $26 \mu\text{gg}^{-1}$; $17.1 \mu\text{gg}^{-1}$ y $6.7 \mu\text{gg}^{-1}$ respectivamente) (Fig. 14; Tabla 3). Concentraciones similares fueron registradas por Gagneten y col. (2007) en los canales Norte, Sur y Las Prusianas de la provincia de Santa Fe.

Desde hace varias décadas, también los plaguicidas han sido detectados en los sistemas acuáticos de diferentes partes del mundo. Por ejemplo, rangos entre $0.2 \mu\text{gL}^{-1}$ a $1000 \mu\text{gL}^{-1}$ de atrazina fueron registrados por distintos autores (Christopher y Bird, 1992; Maguire y Tkacz, 1993; Davis y col., 1994). Es escaso lo que se conoce referido a su impacto en la estructura y dinámica de las comunidades acuáticas y sobre la persistencia y toxicidad de los productos de degradación, incluso existen respuestas contradictorias. Según Stratton (1984), los metabolitos

de degradación presentan una toxicidad menor que la atrazina, mientras que Winkelmann y Klaine (1991) postulan que el metabolito denominado Deethylatrazina es más tóxico.

Con respecto a las concentraciones de plaguicidas observadas en agua, los dos tramos del A° Colastiné correspondientes a los sitios tres y cuatro presentaron el promedio anual de atrazina máximo (0.21 y 0.16 μgL^{-1} , respectivamente). Mientras que los promedios anuales de endosulfán total fueron superiores en los sitios tres y dos (0.015 y 0.014 μgL^{-1} , respectivamente), e inferiores en el sitio cuatro y uno (0.012 y 0.009 μgL^{-1} , respectivamente), con predominio de α END y β END (Fig. 16; Tabla 3).

Los representantes del zooplancton fueron sensibles a los cambios observados en la calidad del agua. Con respecto a la riqueza de especies, se registró un total de 76 taxa, el 19.74 % correspondió a cladóceros y el 80.26 % a rotíferos, por lo tanto puede afirmarse que los representantes de este último grupo fueron los más tolerantes a la contaminación, condición que posiblemente afecte el funcionamiento de todo el ecosistema (Hanazato, 1998). Hanazato (2001) expresa que cuando hay dominancia de rotíferos sobre cladóceros, una menor proporción de materia y energía se transfiere hacia los niveles tróficos superiores. Estudios realizados por De Noyelles y col. (1982) a escala de microcosmos, mostraron que concentraciones de atrazina $<1 \mu\text{gL}^{-1}$ ejercieron efectos sobre la fotosíntesis y biomasa del fitoplancton, también cambios en la estructura de la comunidad zooplantónica, dominada por cladóceros (*Diaphanosoma brachyurum*) y copépodos cyclopoideos (*Tropocyclops prasinus mexicanus*) en períodos previos a las aplicaciones, y luego por rotíferos (De Noyelles y col. 1982). Resultados similares encontraron Gagneten y Paggi (2009) en el río Salado inferior cuando las concentraciones de metales pesados superaron los niveles guía.

La riqueza disminuyó siguiendo el orden: S4>S3>S2>S1. En el canal Santa María (S1) se registró un total de 25 taxa de rotíferos y 1 cladóceros; 36 y 8 en el A° Corralito; 41 y 9 en el sitio 3, y 51 y 13 en el sitio 4, ambos correspondientes al A° Colastiné (Tabla 3). En cuanto a la frecuencia de aparición a lo largo del año, podemos mostrar el siguiente orden decreciente: S4>S3>S2>S1 para rotíferos y S4>S2>S3>S1 para cladóceros. En el canal Santa María (S1) estuvo representado el 40.98 % del total de las especies registradas de rotíferos, mientras que en el A° Corralito el 59.01 %, y en los dos tramos estudiados del A° Colastiné el 67.21 % y 83.6 %.

Con respecto al grupo de los cladóceros, los Moinidos fueron los que presentaron mayor frecuencia de aparición durante todo el muestreo. En el canal Santa María (S1) se observó sólo *Moina micrura* en dos oportunidades, representado el 6.6 % del total de las especies registradas. Mientras que en el A° Corralito (S2) y en los dos tramos estudiados del A° Colastiné (S3 y S4) estuvo representado el 53.33 %, 60 % y 86.6 % respectivamente del total de las especies (Fig. 18).

Los copépodos del Orden Harpacticoidea fueron dominantes en el canal Santa María (S1) y en el tramo del A^o Colastiné correspondiente al sitio tres, en tanto que en el A^o Corralito (S2) y en el sitio cuatro del A^o Colastiné fueron más frecuentes los Cyclopoideos. Sólo en los sitios tres y cuatro se registraron copépodos Calaniodeos (Fig. 20). No se encontraron diferencias significativas cuando se comparó la dominancia entre los cuatro sitios (ANOVA, $p= 0.4507$), tampoco cuando se establecieron comparaciones entre los diferentes meses (ANOVA, $p=0.2156$).

Plaguicidas en agua							
Atrazina	S3 (0.21 μgL^{-1})	>	S4 (0.16 μgL^{-1})	>	S2 (0.05 μgL^{-1})	>	S1 (0.03 μgL^{-1})
Endosulfán	S3 (0.015 μgL^{-1})	>	S2 (0.014 μgL^{-1})	>	S4 (0.12 μgL^{-1})	>	S1 (0.009 μgL^{-1})
Metales Pesados y As en agua							
Cromo	S2 (77.6 μgL^{-1})	>	S4 (74.2 μgL^{-1})	>	S3 (67.9 μgL^{-1})	>	S1 (66.7 μgL^{-1})
Cobre	S4 (28.1 μgL^{-1})	>	S2 (14.7 μgL^{-1})	>	S3 (14.6 μgL^{-1})	>	S1 (13 μgL^{-1})
Plomo	S1 (41.4 μgL^{-1})	>	S3 (32 μgL^{-1})	>	S2 (27.7 μgL^{-1})	>	S4 (24.2 μgL^{-1})
Arsénico	S2 (20.9 μgL^{-1})	>	S3 (18.6 μgL^{-1})	>	S1 (16.8 μgL^{-1})	>	S4 (10 μgL^{-1})
Metales Pesados y As en sedimento							
Cromo	S1 (17.1 μgg^{-1})	>	S3 (11.1 μgg^{-1})	>	S2 (10.4 μgg^{-1})	>	S4 (9.6 μgg^{-1})
Cobre	S1 (26 μgg^{-1})	>	S3 (20.5 μgg^{-1})	>	S2 (20.2 μgg^{-1})	>	S4 (16.7 μgg^{-1})
Plomo	S1 (26.6 μgg^{-1})	>	S2 (26.5 μgg^{-1})	>	S3 (26.1 μgg^{-1})	>	S4 (23.3 μgg^{-1})
Arsénico	S1 (6.7 μgg^{-1})	>	S2 (4.6 μgg^{-1})	>	S4 (4.2 μgg^{-1})	>	S3 (4.1 μgL^{-1})
Riqueza de especies							
Rotífera	S4 (51 Taxa)	>	S3 (41 Taxa)	>	S2 (36 Taxa)	>	S1 (25 Taxa)
Cladocera	S4 (13 Taxa)	>	S3 (9 Taxa)	>	S2 (8 Taxa)	>	S1 (1 Taxa)

Tabla 3: Relación entre las concentraciones de plaguicidas, metales pesados y As en agua y sedimento, y riqueza de taxa registrados en cada uno de los cuatro sitios estudiados. (Promedios de 12 muestras por sitio). Los signos > indican los grados de concentración y riqueza de especies decreciente de izquierda a derecha.

Con respecto a las variaciones temporales, en agosto y septiembre de 2011 se registraron los valores mínimos de taxa de cladóceros y rotíferos, mientras que los máximos se obtuvieron en los meses de febrero y marzo de 2012, mostrando diferencia significativa entre los mismos (ANOVA, $p<0.05$). No se observaron diferencias significativas cuando se comparó la riqueza de especies registradas en las cuatro estaciones (Paired t test, $p = 0.219$).

El único mes donde no se encontraron rotíferos fue en agosto de 2011, sólo se registró en una oportunidad a *M. micrura* en el A^o Colastiné (S4), mientras que en septiembre los rotíferos Bdelloideos fueron los dominantes, y sólo en el A^o Corralito (S2) y en el Colastiné (S4) se registró *L. ovalis* y el cladóceros *M. goeldi*, respectivamente (Fig. 19). En este mes se obtuvieron además los valores máximos de DBO (155 (± 46) mgL^{-1}) y mínimos de nitratos (0.4 (± 0.1) mgL^{-1}) (Fig. 11).

Es importante señalar que en estos dos meses se determinaron en todos los sitios los valores máximos de Cr y Pb en agua, obteniendo los siguientes promedios mensuales para los cuatro sitios: 343.5 (± 6.4) μgL^{-1} y 357.7 (± 5.1) μgL^{-1} de Cr; 139.45 (± 27.3) μgL^{-1} y 154.8 (± 96) μgL^{-1} de Pb, lo que representa concentraciones de Cr 137 y 143 veces superiores a los Niveles

Guía propuestos por la subsecretaría de Recursos Hídricos República Argentina (2003 a), y de Pb 87 y 97 veces (Subsecretaría de Recursos Hídricos República Argentina, 2005 a). No se encontraron diferencias significativas al comparar las concentraciones de metales en agua registradas en agosto y septiembre de 2011 (ANOVA, $p>0.05$), aunque si al compararlos con los restantes (ANOVA, $p<0.001$). También en el mes de agosto de 2011 se registró la mayor concentración de Cu en el A° Colastiné (S4) ($230.8 \mu\text{gL}^{-1}$), superando 35 veces los valores propuestos para la protección de la biota acuática (Fig. 13). Además se registraron concentraciones de As 1.2 y 3.6 veces superiores a los niveles guía argentino y canadiense en el canal Santa María (S1), y 1.16 y 3.5 veces en el A° Corralito (S2) (NG Arg. $< 15 \mu\text{gL}^{-1}$ / NG canadiense $< 5 \mu\text{gL}^{-1}$) (Tabla 4).

A su vez, en estos meses se obtuvieron los valores mínimos de metales y As en sedimento con los siguientes promedios mensuales para los cuatro sitios: agosto de 2011: $14.7 \mu\text{gg}^{-1}$, $17.05 \mu\text{gg}^{-1}$, $11.28 \mu\text{gg}^{-1}$ y $3.6 \mu\text{gg}^{-1}$; y septiembre: $15.93 \mu\text{gg}^{-1}$, $16.93 \mu\text{gg}^{-1}$, $6.27 \mu\text{gg}^{-1}$ y $3.05 \mu\text{gg}^{-1}$ de Cr, Cu, Pb y As respectivamente.

Haciendo referencia al impacto de los plaguicidas, la Atrazina estuvo presente siempre en concentraciones superiores con respecto al endosulfán, aunque nunca sobrepasando los niveles guía para la protección de la biota acuática (NG Arg. $< 3 \mu\text{gL}^{-1}$ / NG canadiense $< 1.8 \mu\text{gL}^{-1}$), en tanto que el endosulfán, cuando fue registrado, generalmente los superó (NG Arg. $< 0.007 \mu\text{gL}^{-1}$ / NG canadiense $< 0.003 \mu\text{gL}^{-1}$). Las concentraciones de plaguicidas fueron variables en los diferentes meses, aunque no mostraron ser significativamente diferentes (ANOVA, $p>0.05$). Dichas fluctuaciones dependieron de las aplicaciones y de los eventos de precipitaciones.

En los meses de agosto y septiembre de 2011 se registraron valores bajos de atrazina en agua (con rangos de $0.006 - 0.3 \mu\text{gL}^{-1}$), hecho que posiblemente tenga que ver con la escasez de precipitaciones mensuales (promedios de los 4 sitios: 40 mm y 12 mm, respectivamente), similares entre los sitios estudiados (ANOVA, $p=0.7875$). En este período la conductividad fue máxima (promedio de los cuatro sitios: 11759 y $12418 \mu\text{S cm}^{-1}$, respectivamente), mostrando una relación inversa y significativa con los eventos de lluvia. En el mes de septiembre en el canal Santa María (S1) el endosulfán superó 5.7 y 13.3 veces los niveles guía argentino y canadiense, respectivamente (Tabla 4). Por lo tanto, las elevadas concentraciones de metales en agua fueron limitantes para la presencia de zooplancton, obteniéndose los valores mínimos de riqueza. Posiblemente la elevada carga de contaminación orgánica, los picos de conductividad obtenidos en el A° Corralito y en el sitio tres del A° Colastiné y la presencia de endosulfán en el canal Santa María también fueron factores determinantes.

Con respecto a las propiedades fisicoquímicas del endosulfán y a sus efectos sobre la biota acuática, se conoce que los isómeros β -end y α -end se degradan a diferentes velocidades en los sistemas acuáticos dependiendo de las condiciones ambientales. Debido a su semi-

volatilidad se han registrados en la atmósfera en diferentes regiones del mundo (Weber y col. 2006). Gutierrez y col. (2012) encontraron que concentraciones subletales provocaron alteraciones en el comportamiento de diferentes especies de zooplancton representativos de la fauna Neotropical, sobre todo afectando la natación y generando estados de desorientación. Según Palma y col. (2009) afecta la actividad de moléculas de señalización endocrina (ecdisteroide) que participan en procesos de muda y en la regulación del desarrollo embrionario en *D. magna*.

En los meses de octubre, noviembre y diciembre las precipitaciones comenzaron a aumentar progresivamente (promedios de los cuatro sitios: 98 mm, 78 mm y 101 mm, respectivamente). A su vez la conductividad disminuyó. Dicho incremento provocó que los plaguicidas lleguen a los cuerpos de agua por escorrentía. Epstein y Grant (1968), han indicado que si llueve dentro de los cuatro días posteriores a la aplicación de endosulfán (dosis 3,5 kg ha⁻¹), la concentración promedio en los líquidos de escorrentía superficial puede llegar hasta 16 µgL⁻¹. También los plaguicidas pueden ingresar de manera directa por el lavado de bidones o su aplicación sobre el cuerpo de agua.

En el mes de octubre se registraron en los cuatro sitios niveles variables de atrazina, con valores máximos en el sitio 3 (0.86 µgL⁻¹), donde no se observaron cladóceros y se registraron sólo rotíferos Bdelloideos. También se observaron metales pesados y As en agua superiores a los niveles guía (ver Tabla 4), entre ellos el As en el A° Corralito superó 3.6 y 10.7 veces los valores guía argentino y canadiense. Por lo tanto consideramos que tanto la presencia de atrazina como la de metales afectaron negativamente la riqueza de zooplancton. También en este mes se registró endosulfán en el A° Corralito (S2) y en el A° Colastiné (S4), cuyas concentraciones superaron los niveles guía (Tabla 4). En dichas oportunidades se registraron 4 y 6 taxa de rotíferos en S2 y S4 y *Macrotrix goeldi* en este último sitio.

Entre los plaguicidas estudiados en el mes de noviembre sólo la atrazina estuvo presente en todos los sitios, con valores máximos en S4, donde si bien no superó el nivel guía canadiense estuvo cercano al límite propuesto (1.73 µgL⁻¹) (Fig. 17). En esta oportunidad se registró el mínimo valor de oxígeno disuelto (4.4 mgL⁻¹). Según algunos autores (e.g. Solomon y col. 1996) el primer indicio de la presencia de atrazina en el ecosistema acuático es la disminución de este parámetro causado por una baja en la producción primaria. En consecuencia, la riqueza de zooplancton se vio afectada negativamente, ya que en ese tramo del A° Colastiné solamente se registró una especie de rotífero (*Filinia longiseta*) y cuatro cladóceros, tres Moinidos y *Diaphanosoma fluviatile* (Tabla 1). A su vez, en este sitio los metales y el As no superaron los estándares propuestos para sedimento, y fueron levemente superiores en agua (Tabla 4). Hasta el presente se sabe que la atrazina produce principalmente efectos directos sobre comunidades fototróficas, entre ellas algales y perifíticas, reduciendo la actividad primaria del ecosistema (Hamilton y col., 1988; Graymore y col., 2001) como

consecuencia del bloqueo del transporte de electrones del Fotosistema II (Woolhouse, 1981; Forney y Davis, 1981; DeLorenzo y col., 2001). En este sentido, Lakshminarayana y col. (1992) encontraron que concentraciones cuyos rangos estuvieron entre 1 y 10 μgL^{-1} disminuyeron la tasa fotosintética y afectaron de manera indirecta al zooplancton. Por lo expuesto anteriormente la principal causa del cambio estructural de la comunidad zooplanctónica se atribuye a modificaciones en su recurso trófico más que a impactos directos sobre sus componentes.

En el mes de noviembre el As superó los estándares sólo en el canal Santa María (1.4 y 4.3 veces, NG argentino y canadiense, respectivamente), en donde dominaron rotíferos Bdelloideos, especies del género *Brachionus* ssp. y *Asplanchna* sp., y no se observaron cladóceros. Si bien en el A° Corralito la concentración de Cr superó 57 veces el nivel guía Argentino, la riqueza de rotíferos y cladóceros fue superior a la hallada en períodos previos: se registraron 19 taxa de rotíferos y 5 especies de cladóceros, algunos de ellos no observados con anterioridad (*Lecane venusta*, *L. papuana*, *Platyonus patulus*, *Moina hutchinsoni*, *Daphnia spinulata* y *Diaphanosoma fluviatile*, entre otros).

Los valores máximos de atrazina en el mes de diciembre fueron registrados en el canal Santa María ($0.135 \mu\text{gL}^{-1}$) y en el A° Corralito ($0.146 \mu\text{gL}^{-1}$). En este último sitio también se registró endosulfán ($0.102 \mu\text{gL}^{-1}$), superando 14 y 34 veces los estándares argentino y canadiense, respectivamente (Fig. 17; Tabla 4). En dicha oportunidad, se encontraron rotíferos Bdelloideos, *Brachionus* ssp., *Hexarthra* sp., *Colurella adriática*, *Asplanchna* sp., y *Lepadella ovalis*, pero no cladóceros. Tampoco estuvo representado este último grupo en el canal Santa María, y sólo tres especies de rotíferos fueron registradas: *Monostya styra*, *Brachionus urceolaris* y *Platyas quadricornis*. En este período si bien no se observaron niveles elevados de metales en agua, en sedimento el Pb superó 1.2 veces los niveles guía (Fig. 15; Tabla 4).

En los meses de enero, febrero y marzo de 2012 las precipitaciones fueron máximas (con promedios mensuales de los cuatro sitios: 122 mm, 132 mm y 141 mm, respectivamente) mostrando diferencias significativas cuando se las comparó con los meses de agosto y septiembre de 2011 (ANOVA, $p < 0.01$). A su vez en este período se obtuvieron los valores mínimos de conductividad ($9951 \mu\text{S cm}^{-1}$, $4253 \mu\text{S cm}^{-1}$ y $2607 \mu\text{S cm}^{-1}$, respectivamente). Se registraron niveles de metales y As en agua similares a los meses de octubre, noviembre y diciembre, con las siguientes concentraciones mínimas y máximas promedios de los cuatro sitios: $7.14 - 25.77 \mu\text{gL}^{-1}$, $15.75 - 19.25 \mu\text{gL}^{-1}$, $7.1 - 11.92 \mu\text{gL}^{-1}$ y $12.92 - 30.36 \mu\text{gL}^{-1}$ de Cr, Cu, Pb y As, respectivamente. Valores mayores de Pb se observaron en sedimento, superando levemente los niveles guía (Tabla 4).

En enero el valor mínimo de atrazina se obtuvo en el sitio 4 correspondiente al A° Colastiné ($0.01 \mu\text{gL}^{-1}$), donde se registraron 2 especies de Moinidos (*M. micrura* y *M. reticulata*) y fueron observados por primera vez copépodos Calanoideos. El valor máximo fue hallado en el A° Corralito ($0.09 \mu\text{gL}^{-1}$), en coincidencia con una escasa riqueza de zooplancton, dominando

rotíferos Bdelloideos y tres especies del género *Brachionus*, a su vez no se registraron cladóceros y copépodos. El endosulfán fue registrado sólo en el canal Santa María donde superó 7 y 16 veces los niveles guía argentino y canadiense (Fig. 17; Tabla 4), afectando a la comunidad zooplanctónica, ya que en este sitio no se encontraron cladóceros, sólo cuatro especies del género *Brachionus* y copépodos Harpacticoideos. También se registró en este momento el máximo valor de pH: 9.07.

En el mes de febrero las concentraciones de atrazina fueron similares en los sitios uno, dos y cuatro ($0.05 \mu\text{gL}^{-1}$), el valor máximo se observó en el tramo correspondiente al sitio tres del A⁰ Colastiné ($0.09 \mu\text{gL}^{-1}$). El endosulfán se registró sólo en S4, pero en concentraciones inferiores al estándar argentino. Los registros de metales en agua y sedimento fueron similares a los observados en enero. La riqueza de rotíferos y cladóceros fue superior en sitio cuatro del A⁰ Colastiné: 23 y 8 taxa, respectivamente. Se observaron por primera vez cladóceros como *Pleuroxus similis*, *Guernella raphaelis*, *Kurzia latissima*, *Leydigopsis curvirostris* y rotíferos del género *Lecane* (*L. papuana*, *L. elsa*, *L. luna*, *L. leontina* y *L. hastata*). En el canal Santa María la riqueza de rotíferos aumentó con respecto a los períodos anteriores, también se observaron copépodos Cyclopoideos, copepoditos y nauplios, aunque no se registraron cladóceros. Sólo en esta oportunidad (Febrero, S1) el Cr en agua no superó los niveles guía (Tabla 4). Además, en este mes se obtuvieron los valores mínimos de pH en los sitios 2, 3 y 4 (6.55, 6.59 y 6.32, respectivamente) mostrando diferencias significativas cuando se compararon con los meses de agosto y septiembre de 2011 (ANOVA, $p < 0.001$).

En el mes de marzo, las concentraciones de metales en agua superaron levemente los estándares argentinos: entre 5.4 y 15.2 veces el Cr, 1.7 y 3.9 veces el Cu y el Pb entre 4 y 9.7, mientras que el As no los superó. En sedimento sólo el Pb los superó 1.12 veces (promedios de cuatro sitios: $39.38 \mu\text{g g}^{-1}$ (± 2.6)) (Tabla 4). Los valores de atrazina fueron bajos, con rangos de 0.01 a $0.03 \mu\text{gL}^{-1}$, y no se registró endosulfán en ninguno de los sitios estudiados. En este mes se observaron los valores máximos de fósforo reactivo soluble (Promedio de los cuatro sitios: 0.74 mgL^{-1} (± 0.1)) y de carbono orgánico total (promedio de los cuatro sitios: 77 (± 15) mgL^{-1}) mostrando diferencias significativas cuando se compararon con los observados en los meses de agosto (2011) y septiembre (ANOVA, $p < 0.0001$) (Fig. 11).

La concentración de carbono orgánico es un indicador de la materia orgánica en descomposición, que en aguas epicontinentales oscila generalmente entre 1 mgL^{-1} y 30 mgL^{-1} (Margalef, 1983). Generalmente cuando supera estos valores el sistema contiene un input de materia orgánica de ecosistemas periféricos, que por escorrentía pueden llegar a los sistemas acuáticos. En este sentido se encontró una correlación positiva y significativa entre los valores de TOC y las precipitaciones ($r = 0.60$; $p = 0.03$)

A su vez, en este mes se obtuvieron los valores máximos de riqueza específica: en el tramo del A⁰ Colastiné correspondiente a S 4 fueron registrados 26 taxa de rotíferos, siguiendo

en orden decreciente S 3, 1 y 2 con 23, 14 y 11 taxa respectivamente. También se registró el mayor número de cladóceros (7, 4, 1 y 1 en S4, S3, S2 y S1, respectivamente), algunos de ellos no representados con anterioridad (*Ceriodaphnia dubia*, *Echinisca elegans* y *Simocephalus* sp.). Como puede apreciarse en la figura 19, en este mes se observó por primera vez un cladóceros en el canal Santa María (S1). También se registraron copépodos Cyclopoideos, Harpacticoideos, copepoditos y nauplios.

En los meses de abril y junio las precipitaciones disminuyeron progresivamente (promedios mensuales de los 4 sitios: 61.5 mm y 16.5 mm) y en julio sólo se registraron 3 mm mensuales en la zona correspondiente al canal Santa María, aumentando en agosto de 2012 (108.7 mm). En dicho período la conductividad se incrementó en los cuatro sitios registrando los siguientes promedios cuatrimestrales: 9759.5 $\mu\text{S cm}^{-1}$ (± 195), 16637.25 $\mu\text{S cm}^{-1}$ (± 132), 15634 $\mu\text{S cm}^{-1}$ (± 234) y 4367.5 $\mu\text{S cm}^{-1}$ (± 235) para S1, S2, S3 y S4 respectivamente.

En abril en el A° Corralito (S2) se registraron niveles de As en agua 4.2 y 12.8 veces superiores a los niveles guías argentino y canadiense (64.34 $\mu\text{g L}^{-1}$), momento en el que se observaron rotíferos Bdelloideos, especies del género *Brachionus* y *C. adriática*, copépodos Cyclopoideos, Harpacticoideos y copepoditos. No estuvieron representados los cladóceros. Según la Subsecretaría de Recursos Hídricos de la República Argentina (2004 a), las concentraciones promedios de As registradas en agua dulce superficial (Río Uruguay, Iguazú, Paraná y de la Plata, periodo 1988-95) se encontraron en rangos 10-17 $\mu\text{g L}^{-1}$. En este trabajo se registraron concentraciones mayores, por ejemplo en el A° Corralito 64.3 $\mu\text{g L}^{-1}$, 52.83 $\mu\text{g L}^{-1}$ en el sitio tres correspondiente al A° Colastiné, 31.45 $\mu\text{g L}^{-1}$ en el canal Santa María y 18.07 $\mu\text{g L}^{-1}$ en el A° Colastiné correspondiente al sitio 4.

En este período se registraron los mayores promedios de metales y As en sedimento. En el canal Santa María (S1), los valores de Cu, Pb y As sobrepasaron los niveles guías (1.05, 1.09 y 5.33 veces, respectivamente) (Tabla 4). Como puede apreciarse en la figura 19, la riqueza de especies fue inferior a la observada en los meses de febrero y marzo. Estuvieron ausentes los rotíferos y cladóceros en dicho canal, solamente se registró un escaso número de copépodos Harpacticoideos. En el tramo del A° Colastiné correspondiente al sitio tres, cuando además los valores de DBO fueron máximos (300 mg L^{-1}), se registraron tres taxa de rotíferos, dos correspondientes al género *Brachionus* y *Trichocerca* sp, una especie de cladóceros (*M. micrura*) y copépodos Cyclopoideos y Harpacticoideos. Mientras que en el tramo del A° Colastiné correspondiente al sitio cuatro se observó una mayor riqueza de especies de rotíferos (14 taxa). Los valores mínimos de atrazina se observaron en S 4 y 1 (0.004 $\mu\text{g L}^{-1}$ y 0.007 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente), mientras que valores levemente superiores fueron registrados en S 2 y 3 (0.02 $\mu\text{g L}^{-1}$ y 0.06 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente). En este mes no se registró endosulfán.

En los cuatro sitios de muestreo, durante los meses de junio, julio y agosto de 2012 se registraron los promedios de metales y As en agua más bajos: 11.21 $\mu\text{g L}^{-1}$ (± 3.3), 13.7 $\mu\text{g L}^{-1}$

(± 10.2), $3.5 \mu\text{gL}^{-1}$ (± 2) y $4.5 \mu\text{gL}^{-1}$ (± 2) de Cr, Cu, Pb y As, en el mes de junio. En julio: $10.3 \mu\text{gL}^{-1}$ (± 4), $6.25 \mu\text{gL}^{-1}$ (± 4.7), $6.49 \mu\text{gL}^{-1}$ (± 4.1) y $5.54 \mu\text{gL}^{-1}$ (± 1) y en agosto de 2012: $6.04 \mu\text{gL}^{-1}$ (± 0.7), $1.75 \mu\text{gL}^{-1}$ (± 1), $3.95 \mu\text{gL}^{-1}$ (± 1.4) y $2 \mu\text{gL}^{-1}$ (± 0) de Cr, Cu, Pb y As respectivamente. También en los meses de junio y julio se observaron las mínimas concentraciones de atrazina en agua (prom de los cuatro sitios $0.02 \mu\text{gL}^{-1}$ y $0.01 \mu\text{gL}^{-1}$ respectivamente). A su vez, junio fue el mes con máxima concentración de endosulfán en agua, registrándose $0.016 \mu\text{gL}^{-1}$, $0.047 \mu\text{gL}^{-1}$, $0.032 \mu\text{gL}^{-1}$ y $0.13 \mu\text{gL}^{-1}$ en S 1, 2, 3 y 4, superando los niveles guía argentino 2.2, 6.7, 4.5 y 18.5 veces respectivamente. En este período se registraron en el canal Santa María sólo rotíferos Bdelloideos, *Notholca acuminata*, *M. micrura* y un número escaso de copépodos Harpacticoideos. En el A° Corralito también dominaron los Bdelloideos y *Brachionus plicatilis*, y al igual que en el A° Colastiné no se registraron cladóceros. En el tramo correspondiente al sitio 3 de este arroyo se observó un mayor número de taxa de rotíferos (13), mientras que en el sitio 4 sólo 3 taxa. En este mes se registraron los valores más bajos de PRS: 0.11mgL^{-1} (± 0.02), mostrando diferencias significativas con los restantes meses (ANOVA, $p < 0.01$).

No se obtuvieron registros de endosulfán en el mes de julio, y la riqueza de especies fue levemente superior a la del mes anterior, registrándose 6 taxa de rotíferos en los sitios uno y tres, 8 y 9 en los sitios cuatro y dos respectivamente. Solamente en este último sitio se encontraron dos taxa de cladóceros (*Alona* sp. y *Diaphanosoma fluviatilis*). En agosto de 2012 se encontró endosulfán sólo en el tramo correspondiente al sitio tres del A° Colastiné, sobrepasando 18.8 veces los niveles guía nacionales, momento en el que se observaron 7 taxa de rotíferos, 1 cladóceros (*Alona* sp.) y unos pocos representantes de copépodos Harpacticoideos. Cabe destacar que en este mes se registraron las temperaturas más bajas, seguido por agosto de 2011. A su vez, se observaron los valores máximos de nitratos (15.3mgL^{-1}), que mostraron ser diferentes significativamente con respecto a agosto y septiembre de 2011 (0.9mgL^{-1} y 0.4mgL^{-1}) (ANOVA, $p < 0.01$) (Fig. 11). Teniendo en cuenta los registros obtenidos durante todo el muestreo anual, solamente en el mes de junio las concentraciones de metales y As en sedimento no sobrepasaron los niveles guía, mientras que en julio el Cu y el As se encontraron en concentraciones 1.31 y 1.5 veces superiores en el canal Santa María. El Cr también en este sitio superó 1.9 veces los niveles guía pero en el mes de agosto de 2012.

Metales Pesados y As en Agua												
S1	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic	Ene	Feb	Mar	Abr	Jun	Jul	Ago
Cr	135,6	142,8	3,5	4,0	3,1	2,8	NS	9,3	6,8	2,9	6,3	2,7
Cu	1,8	1,4	NS	NS	3,5	1,8	3,0	3,9	2,6	3,3	NS	NS
Pb	86,8	183,0	7,0	3,6	5,3	6,7	6,0	6,2	3,4	1,9	1,7	1,3
As	1,2	NS	1,7	1,5	2,1	1,3	1,4	NS	1,4	NS	NS	NS
S2	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic	Ene	Feb	Mar	Abr	Jun	Jul	Ago
Cr	138,0	145,2	3,3	57,4	3,5	2,6	3,3	5,4	2,4	6,1	3,4	2,0
Cu	1,3	NS	2,9	1,4	2,9	3,8	2,4	1,7	5,5	3,5	1,2	NS
Pb	64,2	82,4	4,1	5,2	11,6	9,7	3,6	5,7	8,6	3,6	7,8	3,3
As	1,2	NS	3,6	NS	1,2	2,1	1,2	NS	4,3	NS	NS	NS

S3	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic	Ene	Feb	Mar	Abr	Jun	Jul	Ago
Cr	135,2	144,0	6,6	1,8	3,2	2,9	3,0	11,2	9,0	4,3	2,5	2,3
Cu	NS	NS	3,0	3,0	3,0	3,0	2,4	1,8	6,5	1,1	1,8	NS
Pb	103,1	85,5	4,0	7,6	7,7	10,0	1,9	4,0	8,3	2,9	3,7	3,1
As	NS	NS	1,3	NS	1,6	3,5	1,3	NS	3,2	NS	NS	NS
S4	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic	Ene	Feb	Mar	Abr	Jun	Jul	Ago
Cr	140,8	140,4	3,8	5,9	3,8	3,1	17,6	15,2	14,0	4,7	4,3	2,6
Cu	35,0	NS	NS	1,8	2,1	2,4	3,8	2,1	2,1	NS	NS	NS
Pb	97,5	38,7	3,2	2,7	7,1	3,6	6,4	9,7	8,0	NS	3,1	2,2
As	NS	NS	1,0	NS	1,2	1,2	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Metales Pesados y As en Sedimento												
S1	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic	Ene	Feb	Mar	Abr	Jun	Jul	Ago
Cr	NS	1,91										
Cu	NS	1,06	NS	1,31	NS							
Pb	NS	NS	NS	1,19	NS	NS	1,09	1,21	1,09	NS	NS	NS
As	NS	NS	NS	1,08	NS	NS	NS	NS	5,34	NS	NS	NS
S2	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic	Ene	Feb	Mar	Abr	Jun	Jul	Ago
Cr	NS											
Cu	NS											
Pb	NS	NS	1,25	1,36	1,33	NS	1,25	1,16	1,14	NS	NS	NS
As	NS	1,02	NS	NS	1,04	NS	NS	NS	NS	NS	1,32	NS
S3	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic	Ene	Feb	Mar	Abr	Jun	Jul	Ago
Cr	NS											
Cu	NS											
Pb	NS	NS	1,23	1,21	1,32	1,03	NS	1,04	1,28	NS	NS	NS
As	NS	1,32	NS									
S4	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic	Ene	Feb	Mar	Abr	Jun	Jul	Ago
Cr	NS											
Cu	NS											
Pb	NS	NS	NS	NS	1,14	1,31	NS	1,09	NS	NS	NS	NS
As	1,02	NS										
Plaguicidas en Agua												
S1	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic	Ene	Feb	Mar	Abr	Jun	Jul	Ago
Atr	NS											
End	NS	5,71	NS	NS	1,00	7,14	NS	NS	NS	2,29	NS	NS
S2	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic	Ene	Feb	Mar	Abr	Jun	Jul	Ago
Atr	NS											
End	NS	NS	4,29	NS	14,57	NS	NS	NS	NS	6,71	NS	NS
S3	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic	Ene	Feb	Mar	Abr	Jun	Jul	Ago
Atr	NS											
End	NS	NS	NS	NS	0,71	NS	NS	NS	NS	4,57	NS	18,86
S4	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic	Ene	Feb	Mar	Abr	Jun	Jul	Ago
Atr	NS											
End	NS	NS	2,00	NS	NS	NS	NS	NS	NS	18,57	NS	NS

Tabla 4: Los valores indican el número de veces que se superan los niveles guía. Calculados a partir de relacionar las concentraciones de metales, As y plaguicidas registrados en agua y sedimento con los niveles guía de calidad de agua ambiente para la protección de la biota acuática (aplicable a agua dulce) propuestos por la Subsecretaría de Recursos Hídricos de la República Argentina (2003 a y b, 2004 a y b y 2005 a y b) y la Canadian Environmental Quality Guidelines (2003) (empleada en este caso sólo para sedimento). NS: no supera los niveles guías establecidos.

Como conclusiones podemos mencionar:

✓ La riqueza de cladóceros y rotíferos fue mínima en agosto y septiembre de 2011, mientras que los máximos registros se obtuvieron en los meses de febrero y marzo de 2012,

momento en el que se observaron los valores mínimos de conductividad, las precipitaciones fueron máximas, se obtuvieron los valores mínimos de pH, se observaron los valores máximos de fósforo reactivo soluble y de carbono orgánico total. Todos estos parámetros mostraron diferencias significativas cuando se los comparó con los valores obtenidos en los meses de agosto y septiembre de 2011 (ANOVA, $p < 0.01$). A su vez en estos dos meses las concentraciones de plaguicidas en agua no superaron los niveles guía. Las concentraciones de metales en agua los superaron levemente y en sedimento sólo el Pb se encontró en niveles superiores a los estándares.

✓ Las máximas concentraciones de metales pesados registradas en agua afectaron negativamente al zooplancton, ya que coincidieron con los valores mínimos observados de riqueza de rotíferos y cladóceros. Posiblemente valores extremos de conductividad, pH y la carga de contaminantes orgánicos, estimados indirectamente a través del TOC, DQO y DBO, también fueron determinantes en la riqueza de rotíferos, cladóceros y copépodos relevados. Es importante considerar que en este estudio no se analizaron concentraciones de plaguicidas en sedimento. Tampoco se cuenta con registros de otros herbicidas e insecticidas ampliamente utilizados a nivel regional, como por ejemplo el glifosato o el clorpirifós, que probablemente también ejerzan efectos directos o indirectos sobre la biota acuática.

✓ Las concentraciones de metales y As en agua no fueron significativamente diferentes entre los cuatro sitios, aunque si lo fueron las presentes en el sedimento en cada uno de ellos, que mostraron variaciones entre los meses estudiados. Las concentraciones de Cr en agua siempre fueron superiores a las de Cu, Pb y As. Hubo mayor variabilidad temporal en las concentraciones de metales y As registradas en agua en S 1 y 4 (ANOVA, $p = 0.0190$ y $p = 0.0036$ respectivamente) con respecto a S 2 y 3 (ANOVA, $p = 0.1423$ y $p = 0.0701$ respectivamente).

✓ Las concentraciones de plaguicidas no mostraron ser significativamente diferentes entre los cuatro sitios, tampoco entre los meses estudiados.

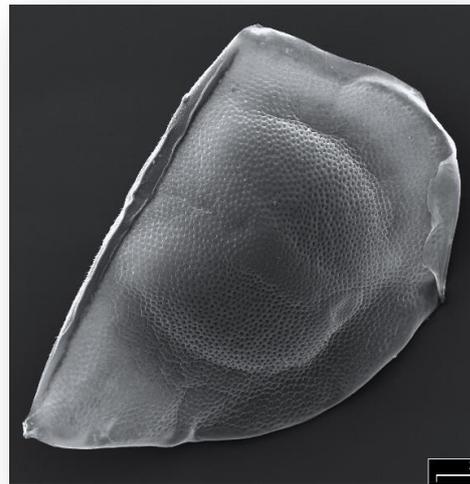
✓ Los ciclos estacionales no influyeron de manera significativa en la riqueza de rotíferos, cladóceros y copépodos registrados, ya que no se observaron diferencias significativas cuando se establecieron comparaciones entre las cuatro estaciones del año (Paired t test, $p = 0.219$).

✓ En el canal Santa María se obtuvieron valores bajos de Clorofila *a* (promedio anual de $2.5 \mu\text{gL}^{-1}$) con rangos mínimos registrados en agosto de 2011 ($0.1 \mu\text{gL}^{-1}$) y máximos en febrero de 2012 ($15 \mu\text{gL}^{-1}$). Estos valores fueron levemente superiores en S 4 correspondiente al A° Colastiné ($9.1 \mu\text{gL}^{-1}$), mientras que en S 3 y 2 los promedios anuales fueron máximos (26.7 y $43.9 \mu\text{gL}^{-1}$ respectivamente). Se encontraron variaciones estacionales al comparar los meses de primavera-verano con respecto a otoño-invierno (Mann-Whitney Test, $p = 0.0029$). No hubo diferencia significativa entre la disponibilidad de nutrientes limitantes (nitratos, nitritos y fósforo) para los organismos fototrópicos disponibles en los cuatro sitios.

CAPÍTULO II

Ensayos de toxicidad en laboratorio.

Aplicación de técnicas de microscopía electrónica y microanálisis



- **Materiales y Métodos**
- **Resultados**
- **Discusión parcial**

4.- MATERIALES Y METODOS

4.1.- Efectos de metales pesados sobre atributos de historia de vida de *Daphnia magna* y cladóceros representativos del Litoral Fluvial Argentino (LFA)

El objetivo abordado en este capítulo es el de indagar el efecto de metales pesados de amplio uso industrial a nivel mundial, en cladóceros representativos de la fauna neotropical y del litoral fluvial argentino. Este área incluye los ríos más grandes del país (Paraná, Paraguay, Uruguay y el Río de la Plata), pertenecientes a la Cuenca del Plata (3.100.000 km²) (Bonetto, 1994). Los resultados fueron comparados con los obtenidos en ensayos con *Daphnia magna* (Dm), una especie de distribución holártica, que si bien es utilizada universalmente como organismo prueba, no son representantes de la diversa fauna de cladóceros neotropical. Así, realizar estudios que evalúen la sensibilidad de representantes de la comunidad zooplanctónica a diferentes tóxicos es ecológicamente relevante porque la fauna argentina de cladóceros posee una notable riqueza, dado que incluye el 87 % de los géneros y el 70 % de las especies conocidas hasta el presente para la fauna neotropical (Paggi, 1998).

4.1.1.- Recolección y selección de las especies test

Se realizaron muestreos en lagunas asociadas a la llanura aluvial del río Paraná medio para obtener ejemplares de los cladóceros planctónicos nativos: *Moinodaphnia macleayi* (Mm) y *Ceriodaphnia dubia* (Cd) con el objetivo de generar cultivos stock, para utilizarlos luego en ensayos de toxicidad. Los organismos fueron colectados con redes de plancton de 200 µm de apertura de malla y cultivados inicialmente en tanques de 100 L ubicados al aire libre en el Laboratorio de Ecotoxicología de la Facultad de Humanidades y Ciencias de la Universidad Nacional del Litoral (FHUC-UNL). Luego fueron transportados al laboratorio, identificados y mantenidos bajo condiciones controladas. Los ejemplares de *Daphnia magna* para iniciar el cultivo fueron aportados por el Instituto Nacional de Limnología (INALI-CONICET-UNL).

La identificación taxonómica se llevó a cabo con microscopio óptico y uso de claves específicas (Wright, 1938; Ringuet, 1958; Dussart y Frutos, 1986; Lopretto y Tell, 1995; Paggi, 1995, entre otros).

A continuación se describen las principales características de las especies seleccionadas:

Moinodaphnia macleayi (King, 1853) (Fam. Moinidae): Único representante conocido del género *Moinodaphnia*. Los caracteres distintivos son la presencia de un ojo compuesto grande, y un ocelo pequeño situado a la altura de la base de las anténulas (Fig. 22 a). Las sedas apicales del endópodo de las antenas son más largas que las del exópodo; en este último se proyectan tres sedas y una larga espina curvada hacia el dorso y ciliada en su parte cóncava

(Fig. 22: b-3B). El postabdomen es grande y delgado. El flanco preanal posee una hilera transversal de espinitas mientras que el post-anal tiene ocho dientes cónicos plumosos de tamaño similar, que culminan en un diente bífido de ramas desiguales. Las garras caudales presentan un pecten poco definido (Fig. 22 b-3C). Su longitud oscila entre 850 y 1.100 μ en hembras partenogénicas (Paggi, 1973). Es considerada una especie tropicopólita (Elmoor-Loureiro, 1998), frecuente en el fondo de los lagos, lagunas y pantanos (Infante, 1988). Si bien presenta una amplia distribución: Norte América (Pennak, 1978), Brasil, Argentina (Paggi, 1973), Venezuela (Infante, 1980; Zoppi de Roa y col., 1985; Rey y Vásquez, 1986), Colombia (Pearse, 1915; Severeyn y Rodríguez, 2000; Barón-Rodríguez y col., 2006; Álvarez, 2010; Aranguren, 2010; Gaviria y col., 2010) entre otros, son escasos los trabajos que la emplean en pruebas de toxicidad.

Ceriodaphnia dubia (Richard, 1894) (Fam. Daphnidae): especie de distribución cosmopolita y neotropical (Negrea 1983 en Ruiz y Bahamonde, 1989), siendo común en ecosistemas leníticos (Degraeve y col., 1992, Anderson y Benke, 1994; Ferrari y Ferard, 1996). Posee una alta sensibilidad a diferentes tóxicos en comparación con otros invertebrados de agua dulce, elevada fecundidad y facilidad para los cultivos, razones por las cuales su uso ha sido estandarizado para ensayos crónicos (Baudo 1987; Kluttgen y col., 1996). Por otra parte, su amplia distribución permite compararla con resultados obtenidos por otros autores en diversas partes del mundo (Fig. 22-c).

Daphnia magna (Straus, 1820) (Fam. Daphnidae): especie de distribución holártica, típica de cuerpos de agua someros y efímeros (Brooks, 1959). Comenzó a ser empleada como organismo de prueba en bioensayos durante la década de 1940 por Anderson (Anderson, 1944) y desde entonces ha sido ampliamente utilizada en estudios de toxicidad. Esta especie es adecuada para ensayos en laboratorio debido a su gran tamaño, alta fecundidad, ciclo de vida corto, reproducción partenogénica, amplia distribución y facilidad de manejo en laboratorio (Adema, 1978; Baudo, 1987). Sin embargo, su uso en estudios ecotoxicológicos ha sido criticado (Buikema y col., 1982; Baird y col., 1989; Koivisto, 1995) ya que a pesar de su amplia distribución en el hemisferio norte, no habita en lagos y lagunas del tamaño que normalmente se ven afectados por los contaminantes (Koivisto y col., 1992) (Fig. 22-d).

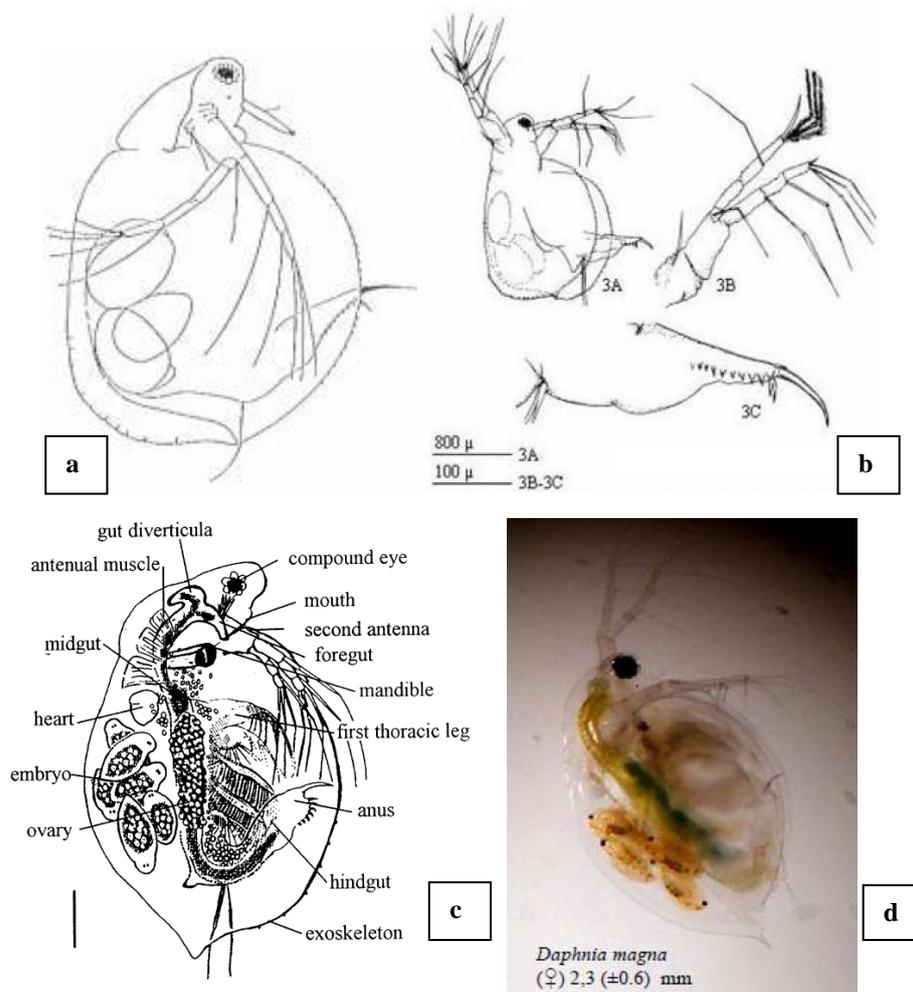


Figura Nº 22: Especies seleccionadas para el desarrollo de la presente tesis: **a:** *M. macleayi* extraídas de Paggi, (1973); **b:** *M. macleayi*: 3A. Vista lateral; 3B Antena; 3C Vista lateral del postabdomen. Extraída de Carruyo-Noguera y col., (2004), tomado de Paggi (1973). **c:** *Ceriodaphnia* sp. (Tomada de Dodson y Frey, 1991). **d:** *D. magna*.

4.1.2.- Mantenimiento de cultivos stock

Los cladóceros fueron cultivados en el Laboratorio de Ecotoxicología de la Facultad de Humanidades y Ciencias, mantenidos en vasos de precipitado con 30 mL de medio sintético (2.4 g de $MgSO_4$, 3.84 g de $NaHCO_3$, 0.16 g de KCl y 2.4 g de $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ en 20 L de agua destilada, pH 7.6 - 7.75, oxígeno disuelto (OD): $7.32 - 7.89 \text{ mgL}^{-1}$, dureza: $160-180 \text{ mg CaCO}_3 \text{L}^{-1}$ (APHA, 1998)), en cámara de cultivo con T° y fotoperíodo constante ($T = 20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ y 16 h luz: 8 h oscuridad, respectivamente). El medio de cultivo se cambió semanalmente, momento en que también se limpiaron los vasos. Se alimentaron 3 veces por semana con una gota ($40 \mu\text{L}$) de *Chlorella vulgaris* por cada recipiente. Esta cepa de microalgas (CLV2) fue importada desde México, donde se la cultiva en el CICESE (Scientific Research and Superior Education Center of Ensenada, Baja California, México). Las algas fueron cultivadas según Sager y Granick (1953) (Bold Basal Medium, BBM), separadas del medio nutritivo por centrifugación (3500 rpm

durante 10 min). El concentrado se diluyó con agua destilada ultrapura y se midió por espectrofotometría hasta obtener una concentración de 1.5λ de absorbancia a 650 nm.

4.1.3.- Preparación de soluciones stock

Las soluciones stock fueron preparadas mediante la dilución de CuSO_4 y $\text{Cr}_2\text{O}_7\text{K}_2$ de grado analítico en agua bi-destilada estéril con el fin de obtener una concentración nominal de 10 mg L^{-1} . Se mantuvieron en la oscuridad a -4°C hasta su determinación analítica. Los experimentos con Pb se realizaron utilizando una solución estándar de calidad analítica: $(\text{NO}_3)_2 \text{Pb}$ (Merck 1.19776.0500- NO_3H 0,5 M / L) con una concentración nominal de 1.000 mgL^{-1} .

Las concentraciones de metales fueron medidas por la tesista de acuerdo a Creed y col., en Environmental Protection Agency, (1994) con un espectrofotómetro de absorción atómica marca Perkin Elmer (modelo PE 8000) equipado con horno de grafito, usando técnicas estandarizadas para la calibración (INTEC-CONICET - Parque Tecnológico Litoral Centro. Santa Fe. Argentina).

Las concentraciones reales medidas en las soluciones stock fueron: 10,14 ($\pm 0,03$), 8,91 ($\pm 0,02$) y 1001 (± 2) mgL^{-1} para Cr, Cu y Pb, respectivamente. Alícuotas de estas soluciones fueron empleadas para mezclar con el medio sintético en los ensayos agudos y crónicos, también en los ensayos donde se aplicaron técnicas de microscopía electrónica y microanálisis.

4.1.4.- Ensayos de toxicidad

4.1.4.1.- Test agudos

Los ensayos agudos permiten reconocer y evaluar los efectos de los contaminantes sobre los organismos en un período de exposición corto en relación a la duración del ciclo de vida (en cladóceros, 24 y 48 horas). Con ellos se estima el rango de concentraciones de la sustancia química a ser analizada que produce una respuesta observable y cuantificable bajo condiciones controladas de laboratorio (Rand y Petrocelli, 1985). En general, la mortalidad y sobrevivencia son las respuestas indicadoras más utilizadas. En estos casos, como medida estimativa de toxicidad se emplea el valor CL_{50} (Concentración Letal 50) siendo la concentración que produce el 50 % de mortalidad de los organismos luego de un período definido de exposición. En ciertos casos se emplean respuestas diferentes a la mortalidad, como la inmovilidad y, en ellos, la expresión correcta es CE_{50} (Concentración Efectiva 50) ó EC_{50} siendo la concentración efectiva para el 50 % de la población (Walter y col., 1997).

En este trabajo los ensayos de toxicidad agudos (48 h) se realizaron siguiendo los procedimientos propuestos por USEPA (2002) (United States Environmental Protection Agency). Se emplearon neonatos (< 24 h) de *D. magna*, *M. macleayi* y *C. dubia* (10 neonatos por réplica, 3 por concentración), se expusieron a 6 concentraciones de Cr ($\text{Cr}_2\text{O}_7\text{K}_2$), Cu (CuSO_4) y Pb ($(\text{NO}_3)_2 \text{Pb}$) diluidas en medio sintético (APHA, 1998), en idénticas condiciones al

cultivo stock. El rango de las concentraciones analizadas se determinó considerando valores publicados para diferentes microcrustáceos de agua dulce e información obtenida a partir de la realización de ensayos preliminares. No se adicionó alimento ni se renovaron las soluciones durante el período testeado. A las 24 y 48 h se registró el número de organismos muertos que fueron reconocidos por la carencia de movilidad al agitar en forma circular los recipientes durante 15 segundos. La aceptabilidad de los resultados se dio cuando la mortalidad en el control no excedió el 10 %, la concentración de oxígeno disuelto al finalizar el ensayo fue mayor a 2 mgL^{-1} , y los valores de pH estuvieron dentro de los límites establecidos por APHA (1998). La sensibilidad de los tres cladóceros al Cu, Cr y Pb se expresó como la concentración en la cual se observó carencia de movilidad para el 50 % de los organismos luego de 24 y 48 h de exposición (CE_{50} 24 y 48 h (Concentración Efectiva)). Estos valores fueron calculados con el método Probit, con un nivel de confiabilidad del 95 % (Finney, 1971).

4.1.4.2.- Test crónicos

Se realizaron ensayos de toxicidad crónicos (15 días), con neonatos (< 24 h) de *D. magna*, *M. macleayi* y *C. dubia* expuestos a Cu (CuSO_4), Cr ($\text{Cr}_2\text{O}_7\text{K}_2$) y Pb ($(\text{NO}_3)_2 \text{Pb}$). Las concentraciones de metales utilizadas en estos ensayos se establecieron tomando como referencia no sólo los valores preliminares obtenidos a partir de los test agudos, sino también considerando las concentraciones empleadas por otros autores y las registradas en campo (Capítulo I). Para estimar las concentraciones superiores empleadas en test crónicos, según Kenaga (1982), se calcula el 20 % de la CE_{50} obtenida en ensayos agudos. Sin embargo, los valores así estimados resultaron muy bajos, especialmente para *C. dubia*, la especie más sensible, por lo tanto como criterio de selección se consideraron en este trabajo valores cercanos e inferiores a las CE_{50} y que fueran a su vez ambientalmente representativos. Para *D. magna*, *M. macleayi* y *C. dubia*, se emplearon las siguientes concentraciones nominales de Cu: 20 (C_1), 40 (C_2) y 60 (C_3) μgL^{-1} ; 5 (C_1), 15 (C_2) y 25 (C_3) μgL^{-1} ; 2.5 (C_1), 5 (C_2) y 10 (C_3) μgL^{-1} . En el caso del Cr: 5 (C_1), 15 (C_2) y 25 (C_3) μgL^{-1} y de Pb: 30 (C_1), 90 (C_2) y 270 (C_3) μgL^{-1} para las tres especies estudiadas.

Los neonatos fueron transferidos a recipientes de 50 mL que contenían 30 mL de medio sintético con las correspondientes concentraciones de metales pesados. Se emplearon 10 réplicas por concentración y un control bajo condiciones idénticas al cultivo stock. Los cladóceros fueron alimentados tres veces por semana con 40 μL de *C. vulgaris* (absorbancia = 1.5 λ , 650 nm). Los valores de pH y oxígeno disuelto fueron registrados al comenzar y finalizar cada ensayo con el fin de corroborar que los parámetros físicoquímicos se encuentren dentro de los rangos propuestos por APHA (1998). Los conteos se realizaron tres veces por semana registrando el N° de organismos vivos y muertos, N° de crías, edad de la primera reproducción

y N° de mudas (como medida indirecta del crecimiento), para luego evaluar sobrevivencia, fecundidad, madurez sexual y crecimiento, respectivamente.

Posibles diferencias significativas entre los tratamientos y sus controles fueron analizadas con ANOVA y post test de Tukey-Kramer con un nivel de confianza del 95 % (Sokal y Rohlf, 1969). Las variables dependientes (número de organismos vivos, número de mudas y el número de neonatos) fueron transformadas en Log n (x1). Antes de cada análisis, se comprobó la normalidad (test de Kolmogorov-Smirnov) de los datos obtenidos. El tests de Kruskal -Wallis y el post test de Dunnet se emplearon para evaluar posibles diferencias significativas en la edad de la primera reproducción entre el control y los tratamientos. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando GraphPad INSTAT (2004).

4.2.- Aplicación de técnicas de microscopía electrónica de barrido (SEM) y microanálisis XEDS (X rays energy dispersive spectrometry) en estudios ecotoxicológicos

El Microscopio electrónico de barrido (SEM, Scanning Electron Microscopy) permite conocer aspectos relacionados con la morfología de pequeñas estructuras características de diferentes organismos, posibilitando establecer relaciones con aspectos fisiológicos y etológicos. Con estos propósitos, en la década del 80' se observó con SEM la forma y el tamaño de los apéndices torácicos que integran el aparato filtrador de los cladóceros (Watts y Petri, 1981) y sus implicancias en la selectividad del alimento (Geller y Muller, 1981). En períodos posteriores se aplicaron además técnicas complementarias al SEM que permitieron determinar los elementos componentes de las superficies observadas y establecer relaciones entre la toxicidad y/o acumulación de ciertos tóxicos (Font y col., 1998; De Samber y col., 2008). También es empleado en el análisis taxonómico para estudios descriptivos de la morfología de estructuras muy pequeñas, así como para detectar malformaciones que escapan al patrón considerado normal, con un mayor nivel de resolución que el ofrecido por el microscopio óptico. El SEM usa electrones en lugar de luz para formar una imagen con una gran profundidad de campo y alta resolución (entre 3 y 20 nm). Sólo puede ofrecer micrografías en blanco y negro puesto que no utiliza la luz, y permite la observación y caracterización superficial de materiales inorgánicos y orgánicos, entregando información morfológica del material analizado.

En la presente tesis se estudiaron con microscopio electrónico de barrido (Philips, modelo SEM 515) (Fig. 23) y mediante la técnica de microanálisis XEDS (X rays energy dispersive spectrometry, marca EDAX, modelo Génesis 2000) las regiones de *C. vulgaris* y *D. magna* donde se depositan preferentemente los metales pesados. Esta técnica reconoce los elementos químicos de la muestra bajo estudio mediante la detección y análisis de los rayos X característicos que son emitidos por la misma. Cuando un haz de electrones incide sobre una

matriz emite rayos X de dos tipos: rayos X característicos y Bremsstrahlung. El Bremsstrahlung corresponde a la radiación X generada debido a la interacción de los electrones incidentes con el núcleo de los elementos de la muestra. Alternativamente, cuando un electrón incidente produce la ionización de uno de los átomos bajo estudio, el átomo ionizado retorna al nivel fundamental emitiendo rayos X. Estos rayos X son “característicos” del tipo de elemento químico que los emite. De este modo se obtuvo un espectro de rayos X correspondiente a la zona de la muestra bajo análisis.

Las muestras fueron previamente fijadas con formaldehído durante 24 h, luego deshidratadas empleando concentraciones crecientes de alcohol hasta llegar al 100 %. Posteriormente fueron colocadas en acetona, montadas y metalizadas (Watt, 1997). Para concretar estos últimos pasos se colocaron sobre una superficie adhesiva de carbón y luego sobre el portamuestras. El metalizado fue realizado en un equipo Balzers SCD 050, permitiendo con este paso, que fueran conductoras de corriente (Ver Fig. 24). Cabe destacar que no se pudo aplicar el secado por punto crítico propuesto por otros autores para muestras biológicas (Geller y Muller, 1981; Han y col., 2006) pues algunos de los insumos necesarios no se encontraban disponibles o se dificultó su compra e importación. Una vez obtenida la imagen con SEM, se realizó una observación general de la muestra para elegir las zonas a analizar. Se obtuvieron microfotografías a escala 1-20 μm para *C. vulgaris* y 20-1000 μm para *D. magna*.



Figura Nº 23: Microscopio Electrónico de Barrido, marca Philips, modelo SEM 515. Centro atómico Bariloche, Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA).

Figura Nº 24: Preparación de muestras para SEM. a- Porta muestras de aluminio con adhesivos de carbón donde se coloca la muestra. b- Equipo metalizador Balzers SCD 050.



4.2.1.- SEM y XEDS. *Daphnia magna*

Se realizaron dos tipos diferentes de ensayos, por un lado se utilizaron ejemplares adultos de *D. magna* correspondientes a una misma camada, y se expusieron a 150, 280 y 350 μgL^{-1} de Cr ($\text{Cr}_2\text{O}_7\text{K}_2$), Cu (Cu SO_4) y Pb (NO_3)₂ Pb por 24 y 48 h en cámara de cultivo con T° y fotoperíodo constante (T= 20 +/- 1 °C y 16 h luz: 8 h oscuridad, respectivamente). Por otro lado, se expusieron durante 48 h (T= 20 +/- 1 °C y 16 h luz: 8 h oscuridad, respectivamente) a dos concentraciones de Cr (150 y 280 μgL^{-1}) a hembras de *D. magna* que fueron cultivadas previamente bajo condiciones de estrés y presentaban efipios en estado de desarrollo avanzado.

Transcurridas 24 y 48 h, tanto las hembras con efipios, como las que no los presentaban, fueron lavadas dos veces con agua destilada y acondicionadas como se explica en la sección anterior (4.2). Los cladóceros fueron alimentados el día previo al inicio del experimento, pero no durante las 48 h de exposición al tóxico, para evitar la absorción del metal por parte de las microalgas. La principal ventaja de realizar ensayos en ausencia de alimento consiste en que es posible cuantificar la toxicidad neta del metal sobre el organismo blanco (Kungolos y Aoyama, 1993). Se obtuvieron micrografías con SEM de microestructuras de *D. magna* y se efectuaron microanálisis en dos regiones de cada organismo expuesto por 24 y 48 h a los metales correspondientes. También se obtuvieron fotos y se realizaron análisis con XEDS de la composición química de efipios en estado de formación, expuestos a Cr. La medición se realizó en dos regiones: en la zona donde se encontraba el embrión y en la cubierta adyacente al mismo.

4.2.2.- SEM y XEDS. *Chlorella vulgaris*

Chlorella vulgaris (CLV2) fue cultivada en un medio rico en sales inorgánicas. Posteriormente fueron centrifugadas para eliminar el medio salino, resuspendiéndolas en agua destilada y midiendo su concentración por espectrofotometría (absorbancia =1.5 λ, 650 nm). Este cultivo se centrifugó nuevamente y al pellet obtenido se le agregaron separadamente soluciones enriquecidas con tres concentraciones de Cr (Cr₂O₇K₂), Cu (CuSO₄) y Pb (NO₃)₂ Pb): 150, 280 y 350 μgL⁻¹ para cada metal. Luego se homogenizaron y se colocaron en cámara de incubación durante 24 y 48 h bajo condiciones controladas de temperatura (23±1°C) e iluminación continua (3000 lux). Transcurridas 24 y 48 h se centrifugaron nuevamente con el fin de obtener el pellet de algas. Estas fueron lavadas con agua destilada, centrifugadas nuevamente y secadas en estufa a 35 °C durante 24 h. Con el fin de determinar las regiones de las microalgas donde se depositan los metales, con SEM y XEDS se analizaron 2 muestras para cada concentración y el control, una de ellas con algas expuestas durante 24 h y la otra durante 48 h.

5.- RESULTADOS

5.1.- Ensayos Agudos

Los valores de CE_{50} para 24 y 48 h calculados con el método Probit basado en Finney (1971) se muestran en la Tabla 5. Éstos disminuyeron con el incremento en el tiempo de exposición a los metales pesados. La sensibilidad de los organismos test varió entre las diferentes especies de cladóceros en el siguiente orden: Cd > Dm > Mm a las 24 y 48 h en los ensayos con Cu y Cr, y Cd > Mm > Dm a las 24 y 48 h en los tratamientos con Pb. El orden de toxicidad fue Cu > Cr > Pb para las tres especies. Durante los ensayos agudos la mortalidad en los controles no excedió el 10 %. Los valores de pH y OD, que se mantuvieron en los rangos requeridos por los protocolos específicos, se muestran en la tabla 6.

Test Agudos		Cobre (mgL^{-1})		Cromo (mgL^{-1})		Plomo (mgL^{-1})	
Especie		24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
<i>D. magna</i>	CE_{50}	0.017	0.012	0.072	0.040	7.587	2.953
	Lim conf	(0.015-0.019)	(0.007-0.017)	(0.060-0.084)	(0.031-0.049)	(6.030-11.375)	(2.062-3.759)
<i>M. macleayi</i>	CE_{50}	0.082	0.037	0.273	0.091	2.5	1.127
	Lim conf	(0.055-0.276)	(0.027-0.062)	(0.166-1.239)	(0.074-0.105)	(1.979-3.378)	(0.799-1.432)
<i>C. dubia</i>	CE_{50}	0.011	0.007	0.066	0.028	1.090	0.343
	Lim conf	(0.009-0.011)	(0.006-0.008)	(0.051-0.106)	(0.023-0.032)	(0.906-1.306)	(0.237-0.441)

Tabla 5: Concentraciones efectivas para el 50 % de la población (CE_{50} , mgL^{-1}) obtenida a las 24 y 48 h de exposición a Cu, Cr y Pb para las tres especies de cladóceros (seis concentraciones y control. Tres réplicas por tratamiento). Se muestran los límites de confianza superior e inferior ($\alpha = 0,05$) entre paréntesis.

Test Agudos	Cobre		Cromo		Plomo	
	OD (mgL^{-1})	pH	OD (mgL^{-1})	pH	OD (mgL^{-1})	pH
<i>D. magna</i>	5,57 ($\pm 0,87$)	7,63 ($\pm 0,15$)	5,79 ($\pm 0,66$)	7,54 ($\pm 0,22$)	5,95 ($\pm 0,65$)	7,54 ($\pm 0,16$)
<i>M. macleayi</i>	6,39 ($\pm 0,52$)	7,49 ($\pm 0,14$)	5,99 ($\pm 0,49$)	7,67 ($\pm 0,23$)	6,81 ($\pm 0,11$)	6,98 ($\pm 0,29$)
<i>C. dubia</i>	7 ($\pm 0,46$)	7,53 ($\pm 0,19$)	5,94 ($\pm 0,71$)	7,6 ($\pm 0,09$)	7,05 ($\pm 0,38$)	7,22 ($\pm 0,42$)

Tabla 6: Valores de oxígeno disuelto (OD, mgL^{-1}) y pH obtenidos al finalizar los ensayos agudos (48 h). Promedios y desvíos de seis concentraciones (tres réplicas por concentración). Se muestran los desvíos estándar entre paréntesis.

5.2.- Ensayos Crónicos: Atributos de historia de vida

El efecto del Cu, Cr y Pb sobre atributos de historia de vida de *D. magna*, *M. macleayi* y *C. dubia* expuestas a 3 concentraciones y el control se muestran en las figuras 25, 26 y 27 para sobrevivencia, fecundidad y crecimiento, respectivamente. La tabla 7 muestra los valores de p correspondientes a los análisis de la varianza (ANOVA) con post test de Tukey-Kramer para los atributos de historia de vida analizados en las tres especies expuestas a metales pesados y el control.

	SOBREVIVENCIA			FECUNDIDAD			NUMERO DE MUDAS			
	<i>D. magna</i>	Cu	Cr	Pb	Cu	Cr	Pb	Cu	Cr	Pb
Control vs C ₁	***	ns	Ns	***	ns	ns	**	ns	ns	
Control vs C ₂	***	ns	***	***	***	*	**	*	*	
Control vs C ₃	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
<i>M. macleayi</i>	Cu	Cr	Pb	Cu	Cr	Pb	Cu	Cr	Pb	
Control vs C ₁	ns	ns	***	**	***	***	**	*	***	
Control vs C ₂	***	***	***	***	***	***	***	***	***	
Control vs C ₃	***	*	***	***	***	***	***	***	***	
<i>C. dubia</i>	Cu	Cr	Pb	Cu	Cr	Pb	Cu	Cr	Pb	
Control vs C ₁	ns	***	*	ns	***	***	ns	***	**	
Control vs C ₂	***	***	**	ns	***	***	**	***	***	
Control vs C ₃	***	***	***	**	***	***	***	***	***	

Tabla 7: Resultados de Análisis de la varianza (ANOVA) con post test de Tukey-Kramer para sobrevivencia, fecundidad y número de mudas de *D. magna*, *C. dubia* y *M. macleayi* luego de ser expuesta a Cu, Cr y Pb por un período de 15 días. ns: No significativo; (*) Diferencias significativas (p<0.05); (**) Diferencias altamente significativas (p<0.01); (***) Diferencias extremadamente significativas (p< 0.001) (n=10).

EDAD DE LA PRIMERA REPRODUCCIÓN (Días)				
		Cobres		
		Cobre	Cromo	Plomo
<i>D. magna</i>	Control	12 (± 2.1) (n:8)	12 (± 2.1) (n:8)	12 (± 2.1) (n:8)
	C ₁	11.3 (± 3) (n:6)	11.7 (± 1.5) (n:10)	11.6 (± 1) (n:10)
	C ₂	12.7 (± 2.3) (n:3)	13.2 (± 3) (n:5)	11 (± 0) (n:5)
	C ₃	12 (± 3.5) (n:3)	10 (± 0) (n:1)*	- *
<i>M. macleayi</i>	Control	12.5 (± 0.9) (n:10)	12.5 (± 0.9) (n:10)	12.5 (± 0.9) (n:10)
	C ₁	12.3 (± 2) (n:6)	14 (± 1.1) (n:4)	13 (± 0) (n:2)*
	C ₂	15 (± 0) (n:1)**	14.3 (± 1.1) (n:3)*	11.7 (± 2.3) (n:3)*
	C ₃	15 (± 0) (n:1)**	15 (± 0) (n:3)*	12 (± 0) (n:3)*
<i>C. dubia</i>	Control	11.6 (± 1.5) (n:9)	11.6 (± 1.5) (n:9)	11.6 (± 1.5) (n:9)
	C ₁	11.9 (± 1.1) (n:7)	12 (± 1.4) (n:2)*	15 (± 0) (n:1)***
	C ₂	11.2 (± 1.6) (n:5)	14 (± 1.4) (n:2)*	- ***
	C ₃	- **	12 (± 1.4) (n:2)*	- ***

Tabla 8: Edad de la primera reproducción (días) de *D. magna*, *M. macleayi* y *C. dubia* luego de ser expuestas a tres concentraciones de Cu, Cr, Pb y el control durante 15 días. (n: número de hembras que alcanzaron la madurez sexual). (*) Diferencias significativas con respecto al control (p<0.05); (**) Diferencias altamente significativas (p<0.01); (***) Diferencias extremadamente significativas (p< 0.001) (n=10) -: sin reproducción.

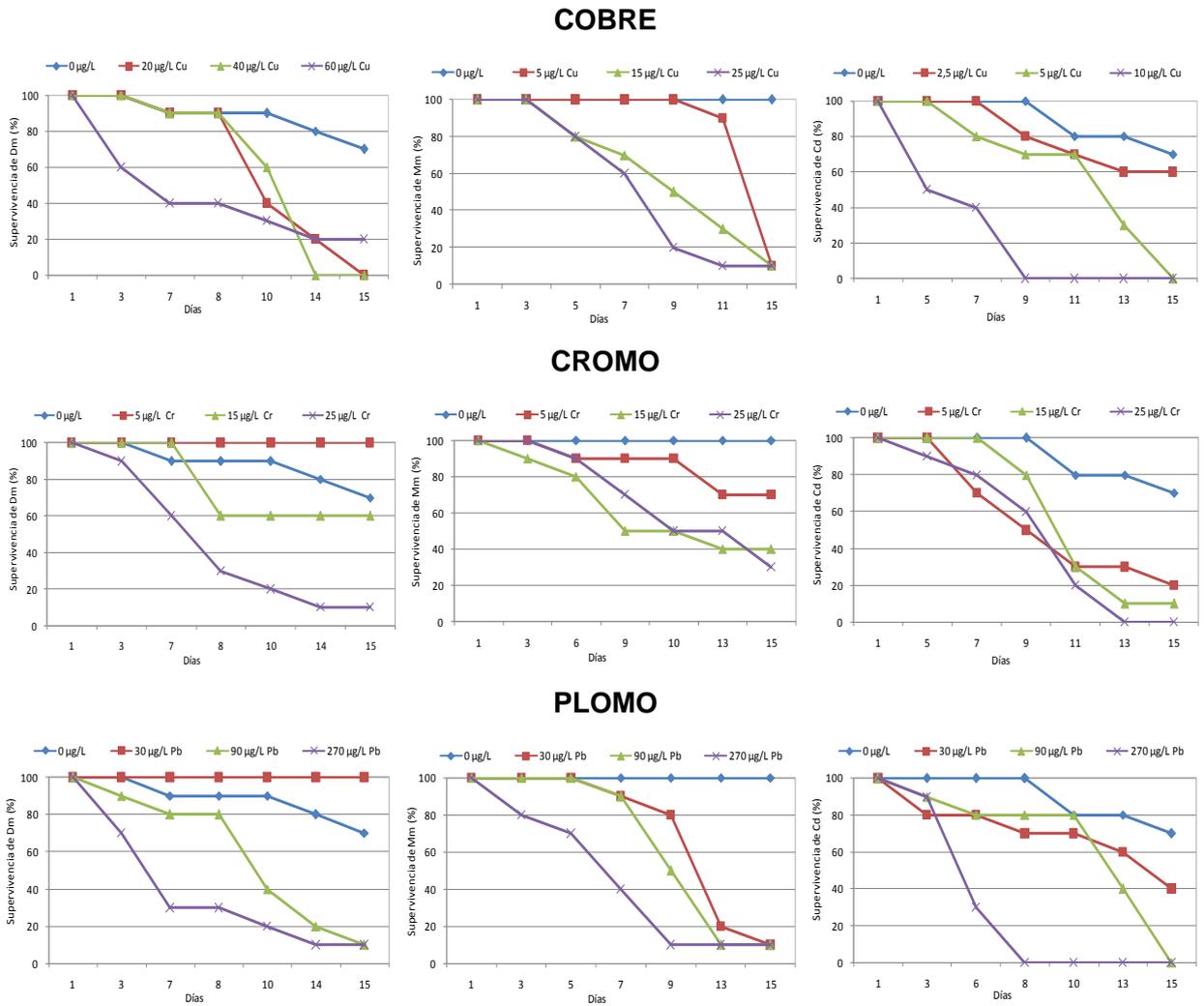
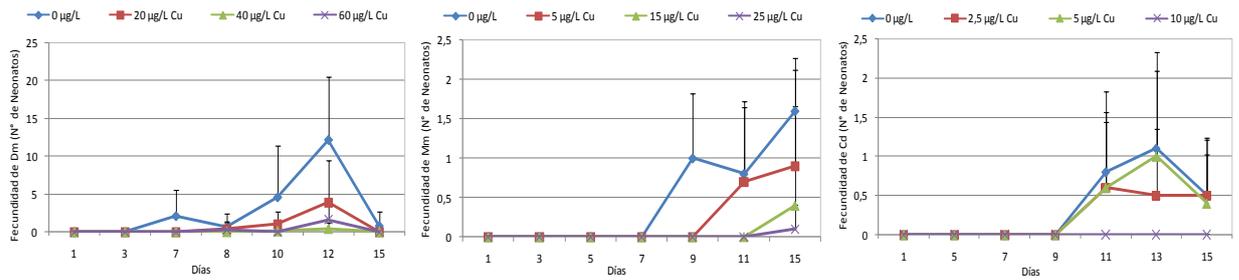
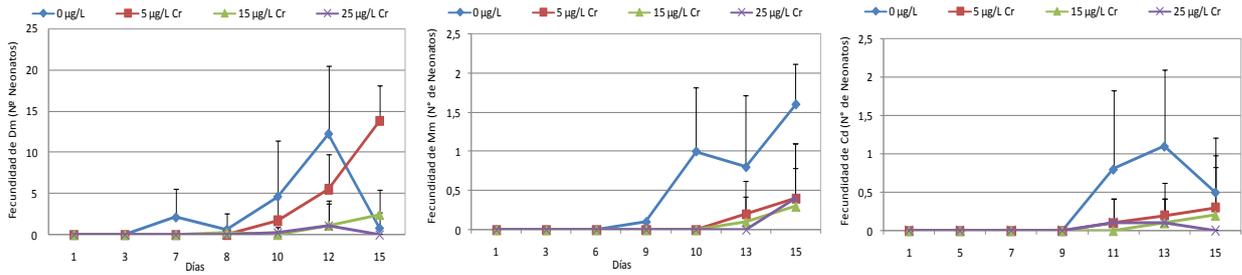


Figura Nº 25: Supervivencia (%) de *D. magna*, *M. macleayi* y *C. dubia* luego de ser expuestas a tres concentraciones de Cu, Cr, Pb y el control durante 15 días. (10 réplicas por tratamiento)

COBRE



CROMO



PLOMO

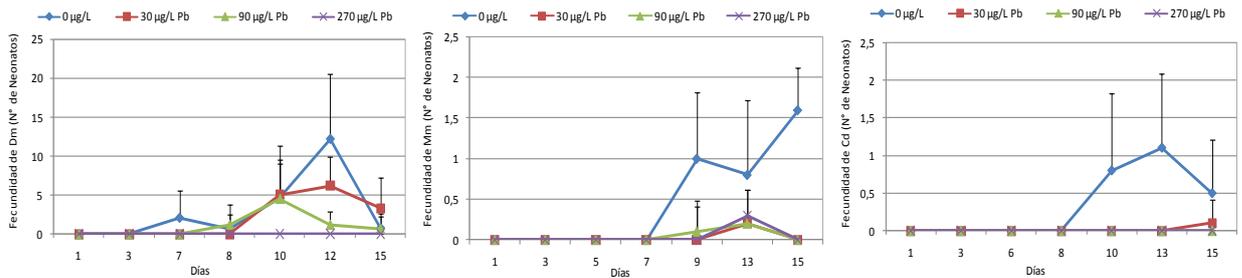
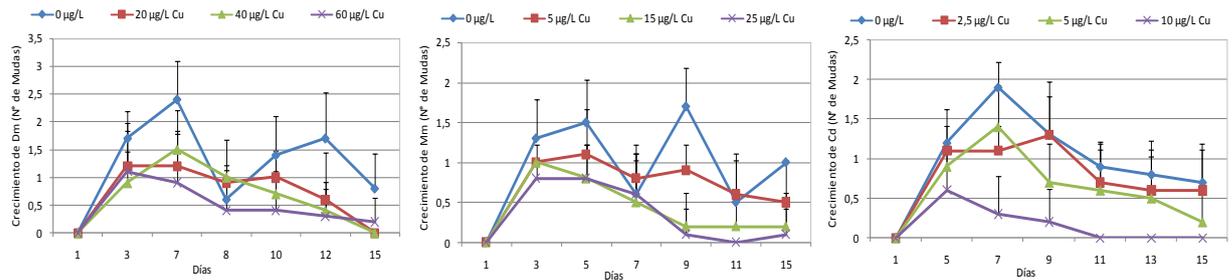
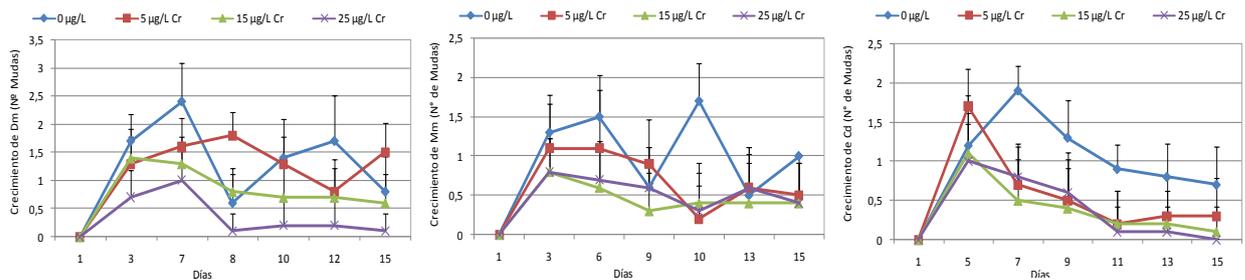


Figura Nº 26: Fecundidad (Nº de Neonatos) de *D. magna*, *M. macleayi* y *C. dubia* luego de ser expuestas a tres concentraciones de Cu, Cr, Pb y el control durante 15 días. Las barras de error indican 1 D.E. (10 réplicas por tratamiento)

COBRE



CROMO



PLOMO

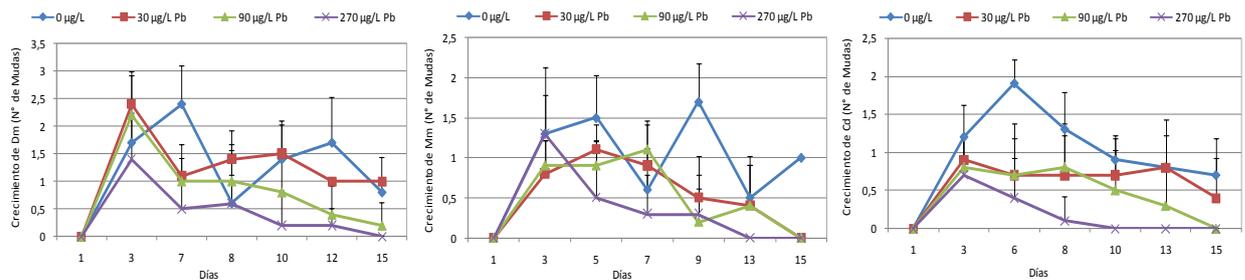


Figura Nº 27: Nº de mudas de *D. magna*, *M. macleayi* y *C. dubia* luego de ser expuestas a tres concentraciones de Cu, Cr, Pb y el control durante 15 días. Las barras de error indican 1 D.E. (10 réplicas por tratamiento)

5.3.- Determinación de posibles zonas de depósito de metales pesados mediante el uso de micrografías electrónicas (SEM) y la técnica de microanálisis XEDS

5.3.1.- *Daphnia magna*. SEM y XEDS

Si bien se registró la presencia de estos metales, no se pudieron determinar zonas de depósito de Cr, Cu y Pb mediante la técnica de microanálisis XEDS. Las concentraciones estuvieron cercanas al límite de detección del equipo en la mayoría de los casos, motivo por el cual decidimos que esta técnica no resultó conveniente para cumplir con el objetivo propuesto, al menos en las concentraciones ensayadas. Por otro lado, concentraciones mayores podrían provocar la mortalidad de los organismos en estudio. Por este motivo se presentan a continuación solamente los resultados obtenidos a partir de exponer a *D. magna* a diferentes concentraciones de Cr, con el fin de mostrar cómo se trabajó con las técnicas y matrices señaladas. No se observaron diferencias entre las muestras expuestas durante 24 h y 48 h,

tampoco entre las distintas regiones analizadas sobre el exoesqueleto, aunque si se registró diferencia entre la concentración de Cr presente sobre el embrión de los efipios con respecto a la observada en la cubierta adyacente del huevo.

A continuación, se presentan algunas de las micrografías obtenidas con SEM (Figs. 28, 30 y 32) delimitando las regiones de *D. magna* donde se realizó microanálisis, los espectros de energía alcanzados para las muestras (Figs. 29, 31 y 33), y las tablas con la composición química obtenida a partir del análisis de los espectros (Tablas 9, 10 y 11).

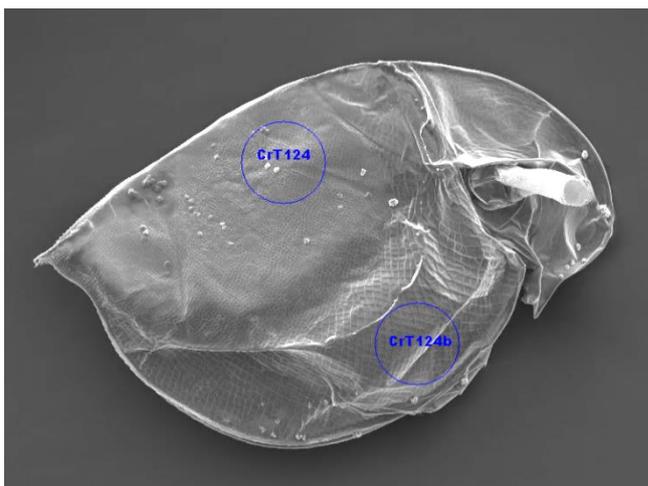


Figura N° 28: Micrografía de *D. magna* expuesta a $150 \mu\text{gL}^{-1}$ de Cr durante 24 h. Las zonas correspondientes a Cr T1 24 y Cr T1 24-b indican las regiones del exoesqueleto donde se efectuó microanálisis con XEDS.

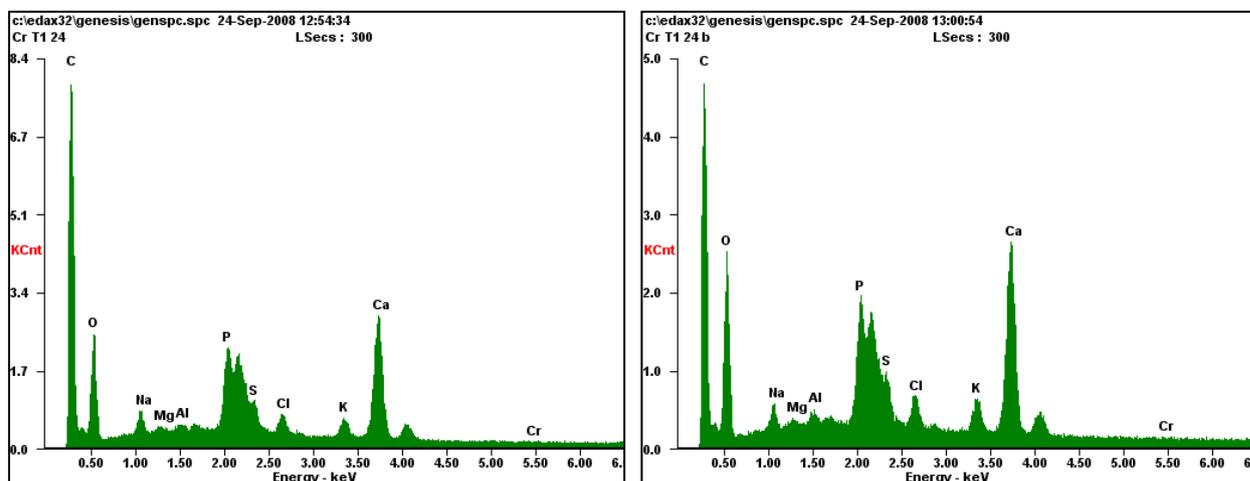


Figura N° 29: Espectros de energías obtenido mediante XEDS barriendo una superficie con SEM correspondiente al exoesqueleto de *D. magna* expuesta a $150 \mu\text{gL}^{-1}$ de Cr durante 24 h, (Cr T1 24 y Cr T1 24-b).

Elemento	Wt% CrT124	Wt% CrT124-b
Na	10.8	07.77
Mg	01.36	01.40
Al	01.56	02.57
P	21.04	19.83
S	09.99	10.43
Cl	06.64	06.78
K	06.01	06.93
Ca	42.03	43.69
Cr	00.58	00.60

Tabla 9: Composición química obtenida mediante XEDS barriendo una superficie correspondiente al exoesqueleto de *D. magna* expuesta a $150 \mu\text{gL}^{-1}$ de Cr durante 24 h: Cr T1 24 y Cr T1 24-b (Wt%: porcentaje de peso atómico).

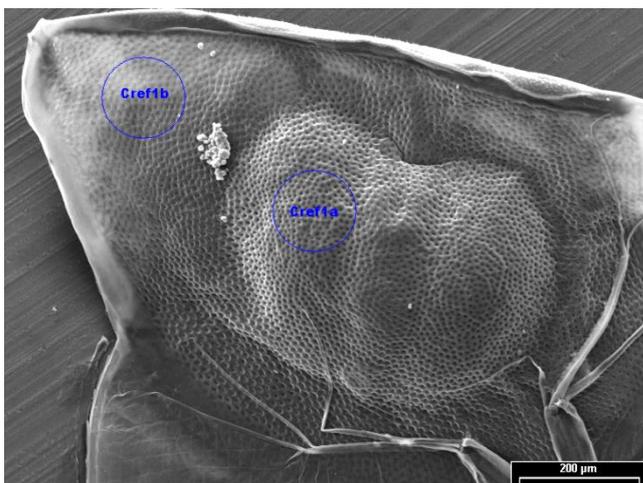


Figura N° 30: Micrografía de efipio de *D. magna* expuesta a $150 \mu\text{gL}^{-1}$ de Cr durante 48 h. Las zonas correspondientes a Cr Ef T1-a y Cr Ef T1-b indican las regiones donde se efectuó microanálisis con XEDS. (Cr Ef T1-a: zona donde se encuentra el embrión y Cr Ef T1-b: cubierta adyacente al embrión).

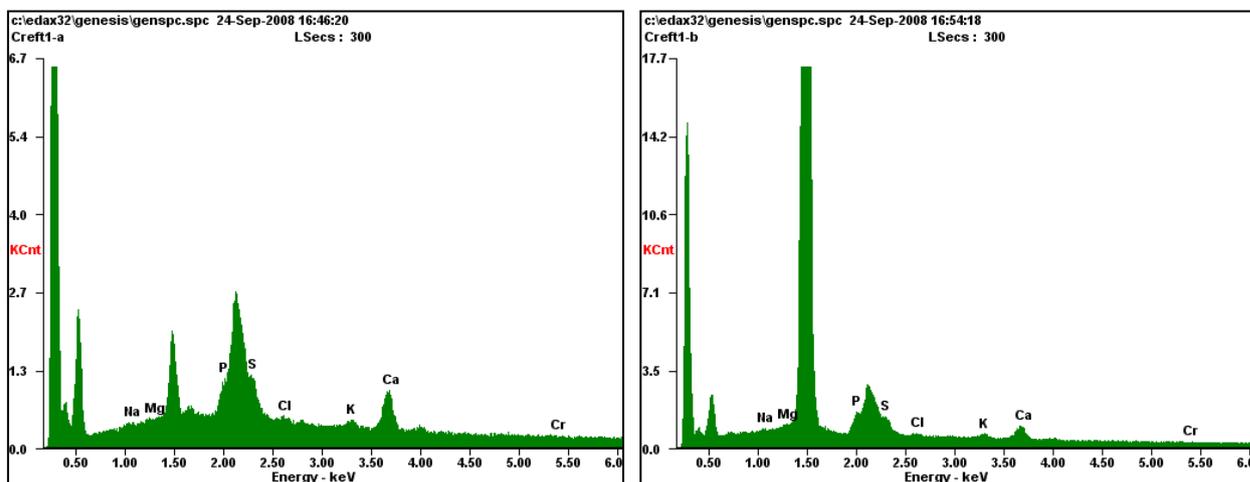


Figura N° 31: Espectros de energías obtenido mediante XEDS barriendo una superficie con SEM correspondiente al efipio de *D. magna* expuesta a $150 \mu\text{gL}^{-1}$ de Cr durante 48 h (Cr Ef T1-a: zona donde se encuentra el embrión y Cr Ef T1-b: cubierta adyacente al embrión).

La medición “Cr Ef T1-a” abarca la zona donde se encuentra el embrión, mientras que la zona correspondiente a “Cr Ef T1-b” abarca parte de la cubierta del efipio (sin embrión). El pico alto que se aprecia seguido al Mg en la figura N° 31 (Cr Ef T1-b) representa al aluminio, este no debe ser tenido en cuenta ya que no es un elemento componente de *D. magna*, sino que su presencia se debe a la captación de este metal por formar parte del porta muestra.

Elemento	Wt% Cr Ef T1-a	Wt % Cr Ef T1-b
Na	02.60	02.21
Mg	01.10	06.03
P	21.47	25.67
S	30.31	31.09
Cl	03.29	04.35
K	05.08	06.42
Ca	34.49	24.22
Cr	01.67	00.00

Tabla 10: Composición química obtenida mediante XEDS barriendo la superficie con SEM correspondiente al efipio de *D. magna* expuesta a $150 \mu\text{gL}^{-1}$ de Cr durante 48 h (Cr Ef T1-a: zona donde se encuentra el embrión y Cr Ef T1-b: cubierta adyacente al embrión (Wt%: porcentaje de peso atómico).

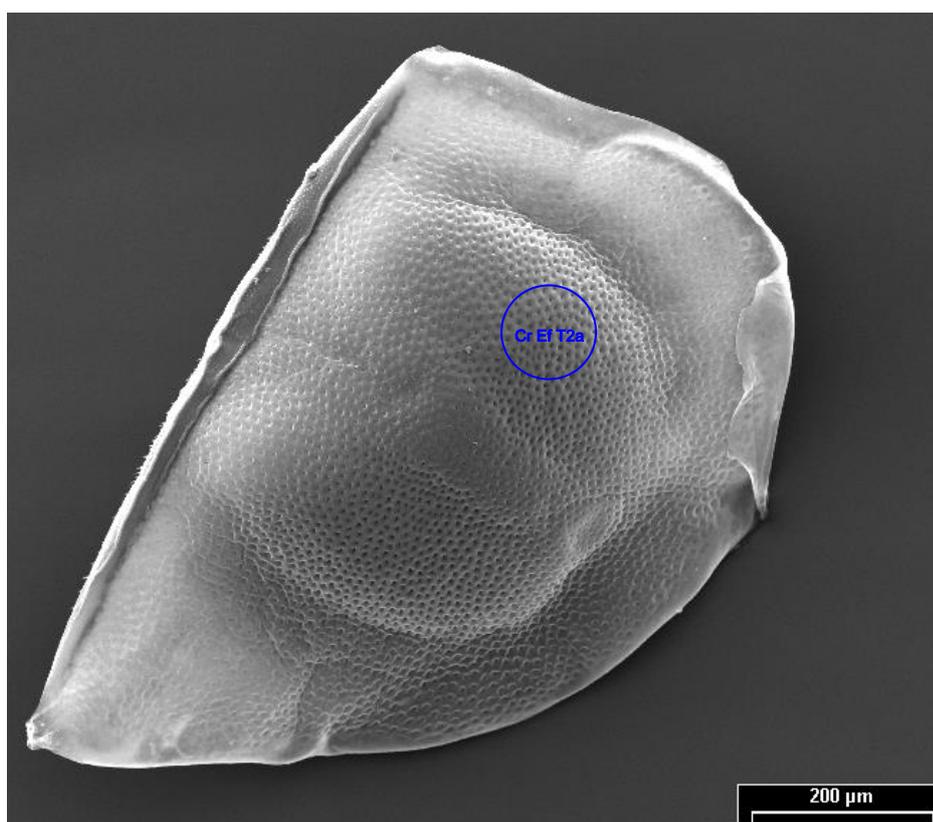


Figura N° 32: Micrografía de efipio de *D. magna* expuesta a $280 \mu\text{gL}^{-1}$ de Cr durante 48 h. La zona correspondiente a Cr Ef T2-a indica la región donde se efectuó microanálisis con XEDS (Cr Ef T2-a: zona donde se encuentra el embrión).

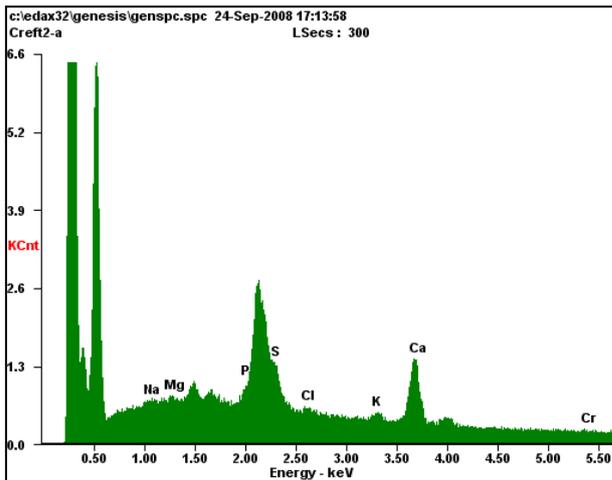


Figura N° 33: Espectros de energía obtenido mediante XEDS barriendo una superficie con SEM correspondiente al efipio de *D. magna* expuesta a $280 \mu\text{gL}^{-1}$ de Cr durante 48 h (Cr Ef T2-a: zona donde se encuentra el embrión).

Elemento	Wt% CrEf T2-a
Na	08.26
Mg	01.47
P	12.84
S	26.65
Cl	01.45
K	02.97
Ca	44.01
Cr	02.35

Tabla 11: Composición química obtenida mediante XEDS barriendo la superficie con SEM correspondiente al efipio de *D. magna* expuesta a $280 \mu\text{gL}^{-1}$ de Cr durante 48 h (Cr Ef T2-a: zona donde se encuentra el embrión - Wt%: porcentaje de peso atómico).

5.3.2.- *Chlorella vulgaris*. Estudio comparativo con SEM

Chlorella vulgaris se ubica en el Orden Chlorococcales, correspondiente a la Clase Chlorophyta. Es una microalga unicelular (3-5 μ), considerada cosmopolita ya que fue registrada en diferentes partes del mundo, tanto en cuerpos de agua dulce como marinas (Richmond, 2000). Las células exhiben un ciclo biológico simple. La reproducción es exclusivamente asexual, cada célula madura se divide produciendo 4, 8 o rara vez 16 autoesporas esféricas. Estas presentan un núcleo central, una mitocondria y un solo cloroplasto parietal, carecen de pirenoides y contienen algunos granos intertilacoides de almidón. Son liberadas por ruptura o disolución de la membrana y pared celular de la célula madre (Reynolds, 1984). Según Nečas (1969), no sólo la luz influye de manera importante sobre la división nuclear y su ciclo de vida, sino también las características del medio de cultivo. Por lo que la presencia de metales en el medio podría estimular la liberación de autosporas, o bien producir lisis celular, con consecuente liberación de las mismas.

A continuación se muestran las micrografías obtenidas con SEM de *C. vulgaris* expuesta a tres concentraciones de Cr, Cu y Pb y el control.

CONTROL

En las micrografías que se muestran a continuación pueden observarse células de *C. vulgaris* cultivadas en el ensayo control (sin metales pesados). Éstas no sufrieron cambios, manteniendo su forma esférica y pudiendo diferenciarse una zona central de mayor densidad óptica.

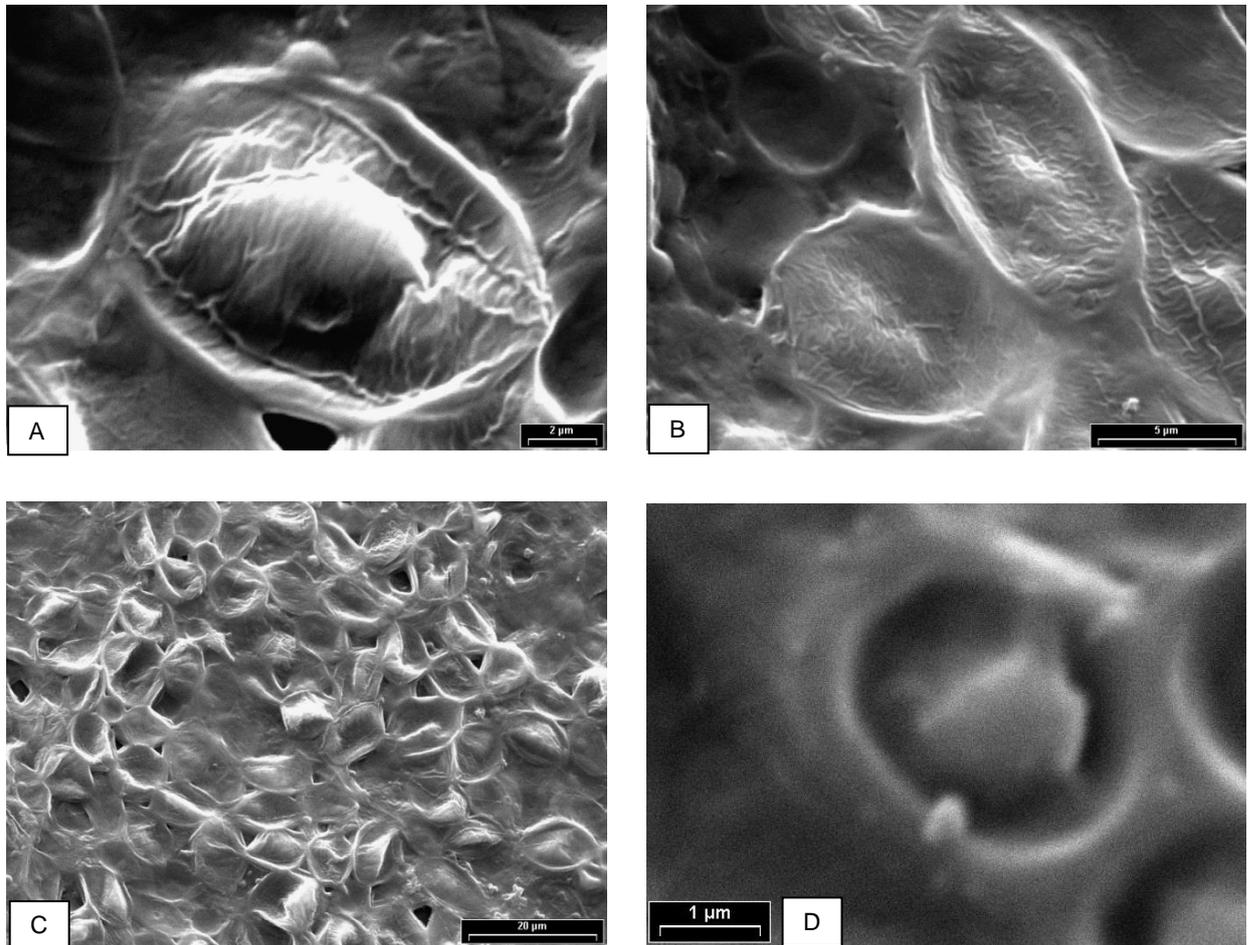
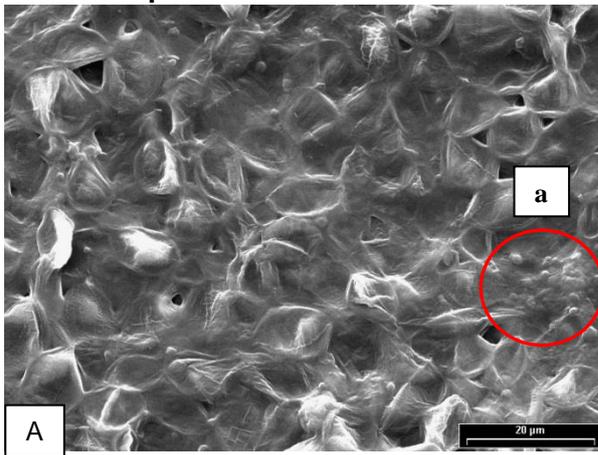


Figura N° 34: Micrografías obtenidas con SEM de células de *C. vulgaris* correspondientes a los controles a distintas escalas: A: 2 μm, B: 5 μm, C: 20 μm y D: 1 μm.

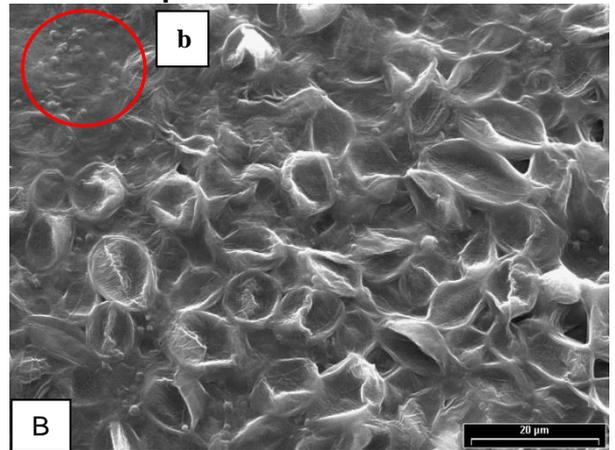
Como se observa en la figura 35, en la concentración menor e intermedia de Cr, si bien las células mantuvieron su forma, algunas no mostraron la zona central del citoplasma que se observa en el control, sobre todo las expuestas durante 48 h a $150 \mu\text{gL}^{-1}$ y por 24 y 48 h a $280 \mu\text{gL}^{-1}$. Se aprecian autosporas libres (a y b).

CROMO ($150 \mu\text{gL}^{-1}$)

24 h de exposición

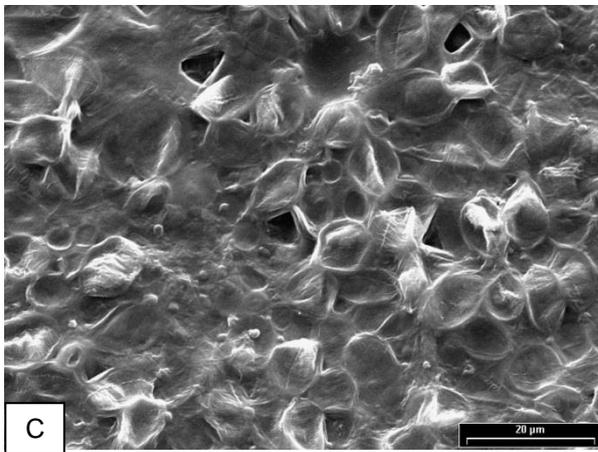


48 h de exposición



CROMO ($280 \mu\text{gL}^{-1}$)

24 h de exposición



48 h de exposición

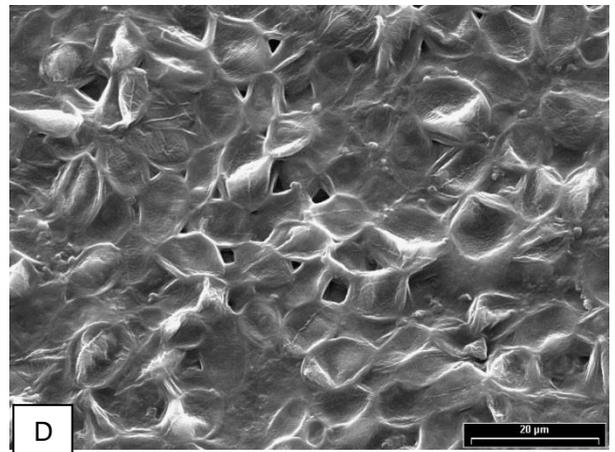
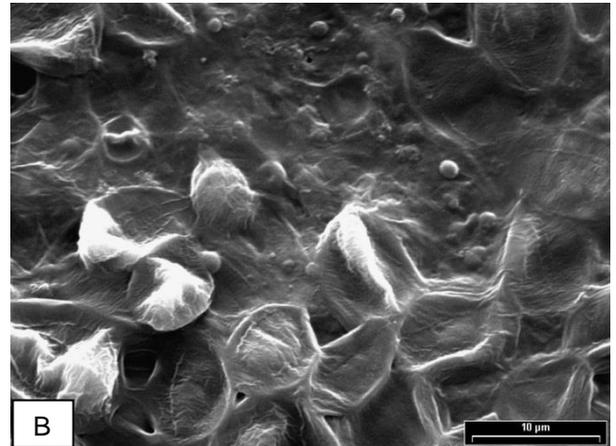
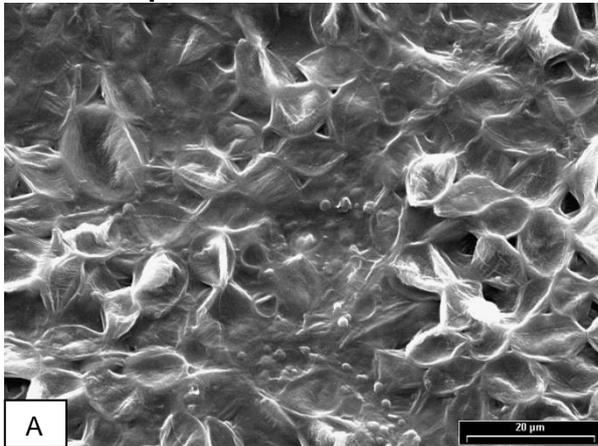


Figura N° 35: Micrografías obtenidas con SEM de células de *C. vulgaris* expuestas a $150 \mu\text{gL}^{-1}$ (A y B) y $280 \mu\text{gL}^{-1}$ (C y D) de Cr durante 24 y 48 h.

Contrariamente, en la concentración mayor ($350 \mu\text{gL}^{-1}$) las células de *C. vulgaris* mostraron desorganización de la estructura celular, ya que pudieron visualizarse restos de membranas, fragmentos celulares y autosporas libres (Fig. 36).

CROMO ($350 \mu\text{gL}^{-1}$)

24 h de exposición



48 h de exposición

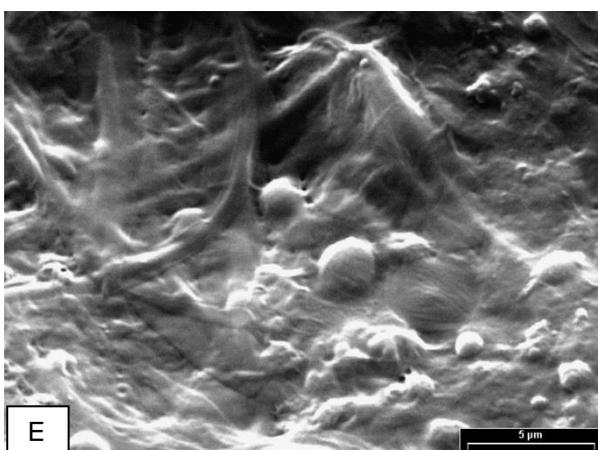
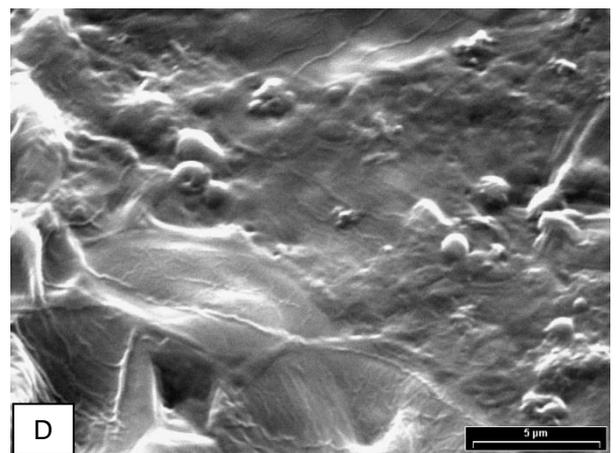
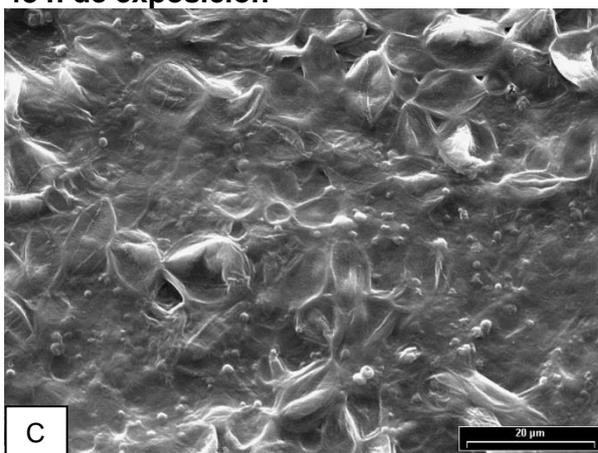
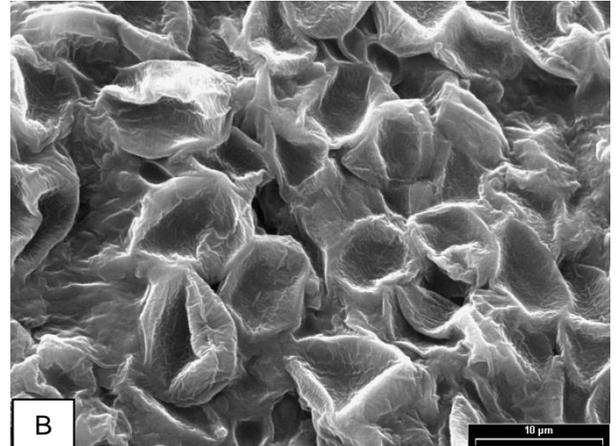
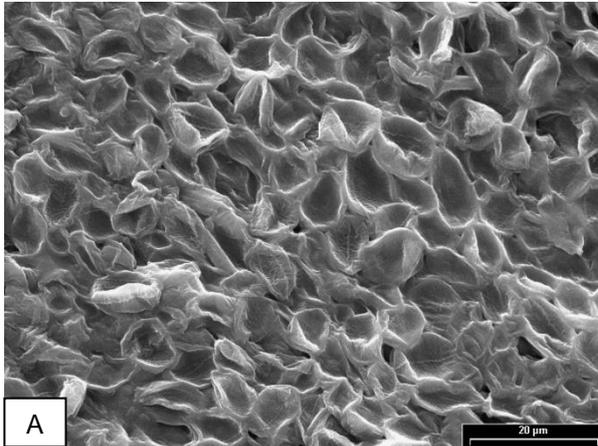


Figura N° 36: Micrografías obtenidas con SEM de células de *C. vulgaris* expuestas a $350 \mu\text{gL}^{-1}$ de Cr durante 24 h (A y B) y 48 h (C, D y E).

Como se observa en la figura 37, las algas expuestas a la menor concentración de Cu ($150 \mu\text{gL}^{-1}$) mantuvieron su morfología tanto a las 24 como a las 48 h de exposición, la mayoría de las células no presentaron contenido citoplasmático. No se observaron restos celulares ni autosporas.

COBRE ($150 \mu\text{gL}^{-1}$)

24 h de exposición



48 h de exposición

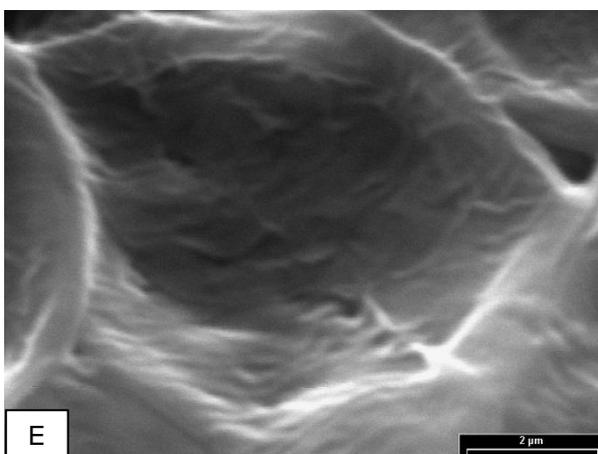
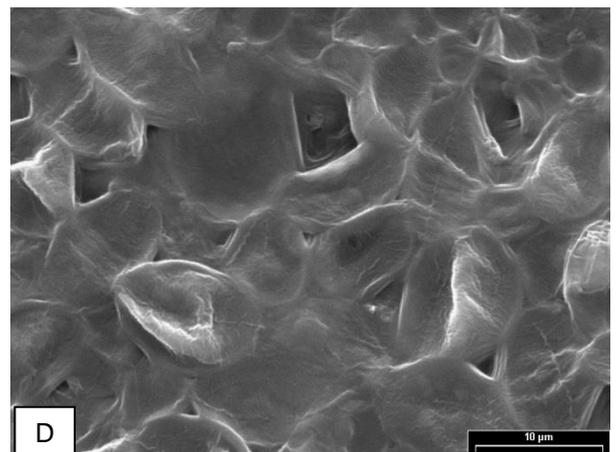
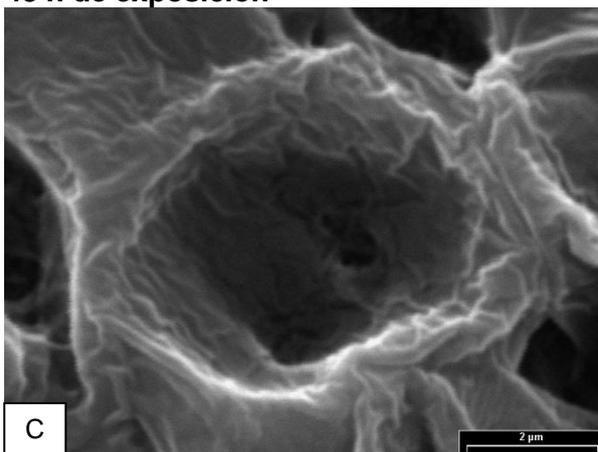
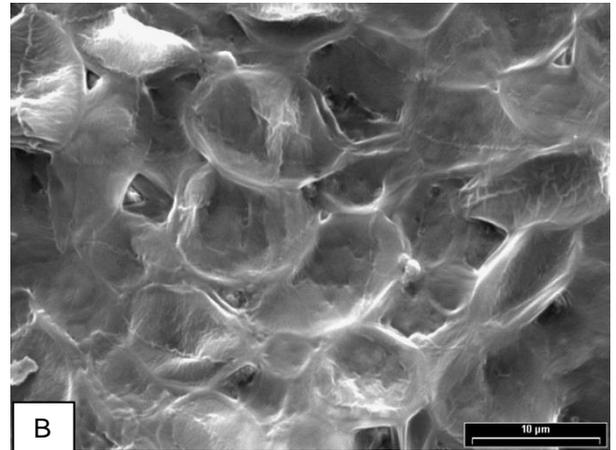
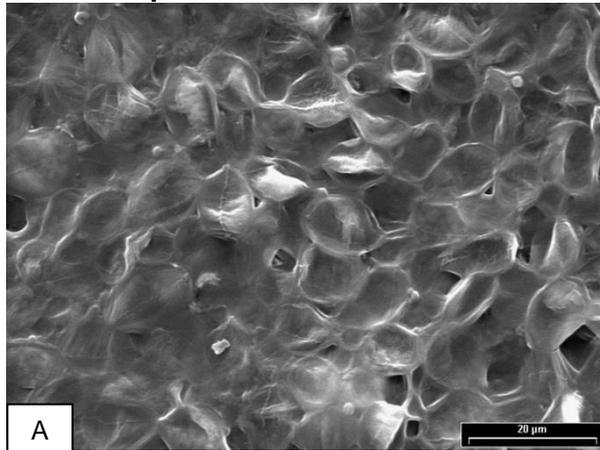


Figura N° 37: Micrografías obtenidas con SEM de células de *C. vulgaris* expuestas a $150 \mu\text{gL}^{-1}$ de Cu durante 24 h (A y B) y 48 h (C, D y E).

Si bien la mayoría de las algas expuestas a la concentración intermedia ($280 \mu\text{gL}^{-1}$) (Fig. 38) y mayor ($350 \mu\text{gL}^{-1}$) (Fig. 39) de Cu mantuvieron su forma esférica, demostraron no tener contenido citoplasmático, se observaron pocas autosporas libres y restos celulares, sobre todo en las expuestas durante 48 h.

COBRE ($280 \mu\text{gL}^{-1}$)

24 h de exposición



48 h de exposición

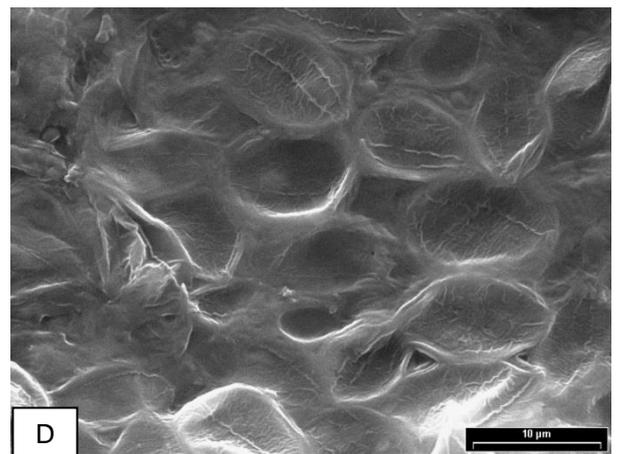
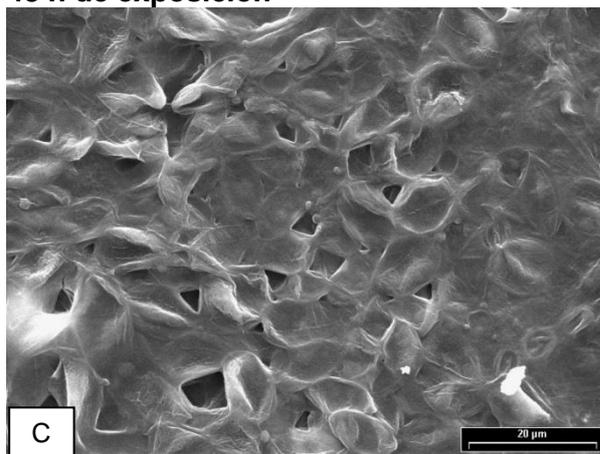
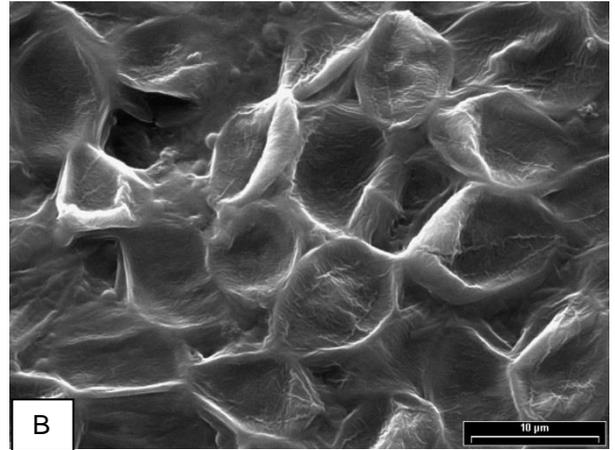
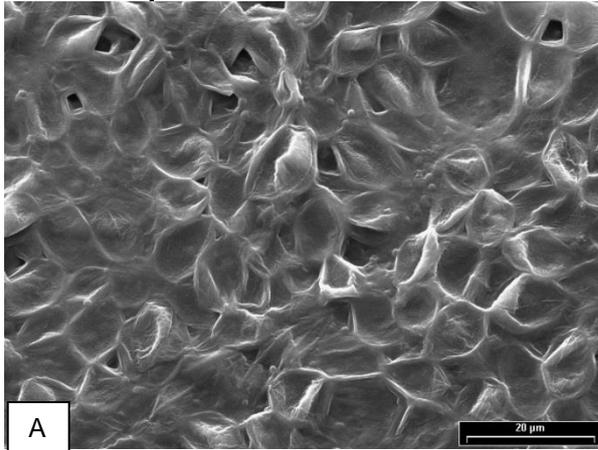


Figura N° 38: Micrografías obtenidas con SEM de células de *C. vulgaris* expuestas a $280 \mu\text{gL}^{-1}$ de Cu durante 24 h (A y B) y 48 h (C y D).

COBRE ($350 \mu\text{gL}^{-1}$)

24 h de exposición



48 h de exposición

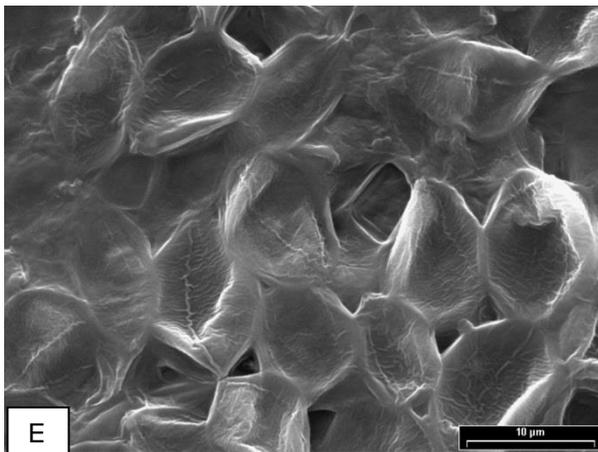
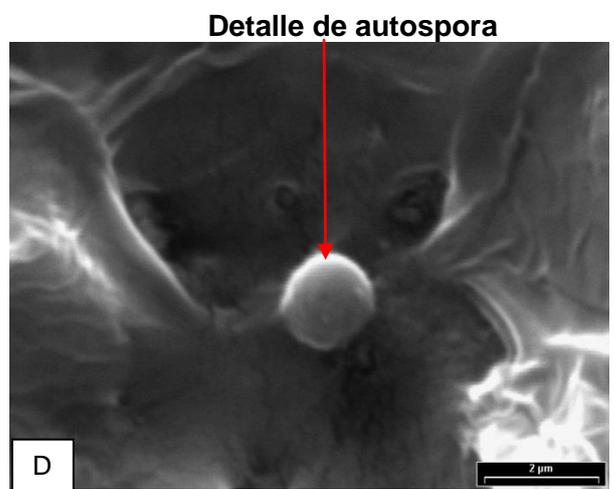
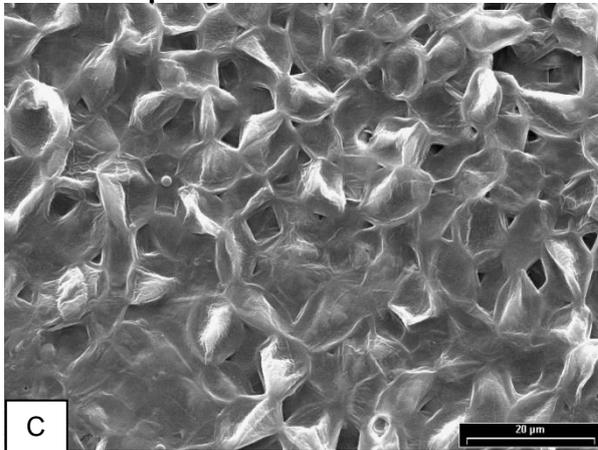
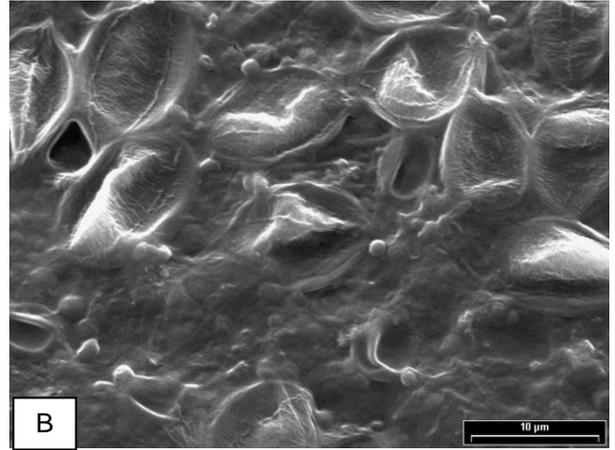
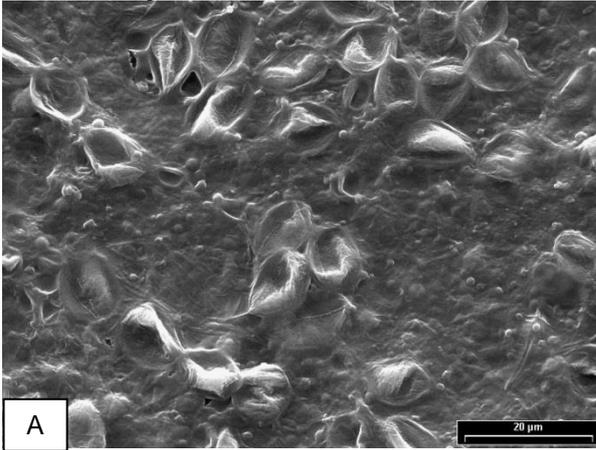


Figura N° 39: Micrografías obtenidas con SEM de células de *C. vulgaris* expuestas a $350 \mu\text{gL}^{-1}$ de Cu durante 24 h (A y B) y 48 h (C, D y E).

Tal como se muestra en las figuras 40, 41 y 42 las células expuestas al Pb no presentaron contenido citoplasmático, se observaron zonas con agrupaciones celulares y regiones mayores en donde se distinguieron restos de estructuras celulares y autosporas. En las muestras donde predominaron restos de membrana y pared celular también se observaron mayor número de autosporas libres. No se apreciaron diferencias entre las algas expuestas durante 24 y 48 h.

PLOMO ($150 \mu\text{gL}^{-1}$)

24 h de exposición



48 h de exposición

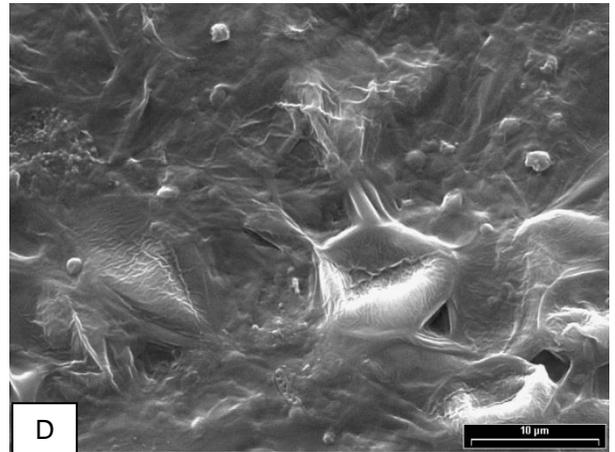
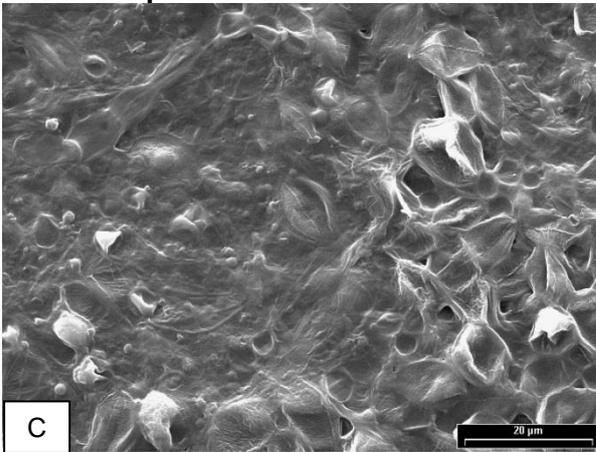
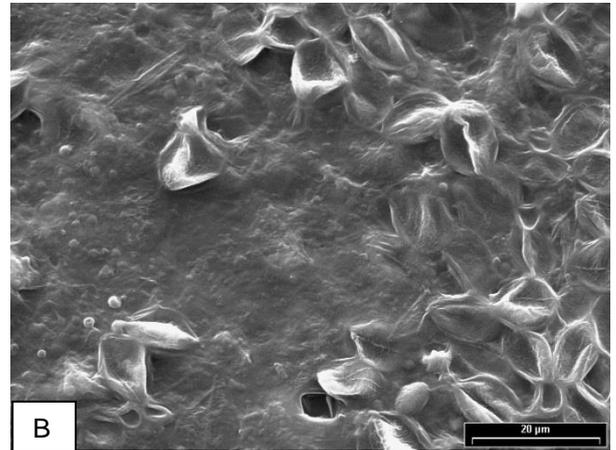
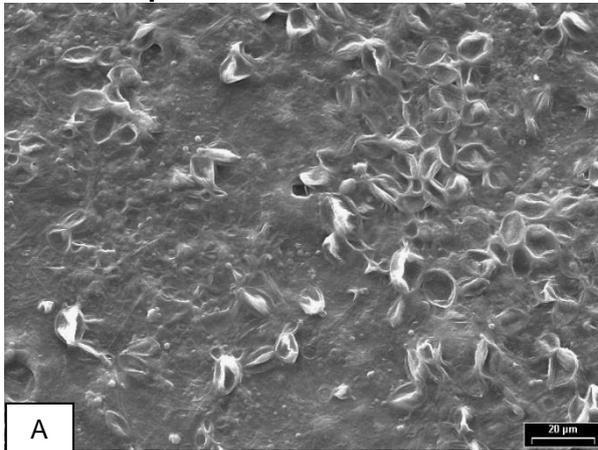


Figura N° 40: Micrografías obtenidas con SEM de células de *C. vulgaris* expuestas a $150 \mu\text{gL}^{-1}$ de Pb durante 24 h (A y B) y 48 h (C y D).

En la concentración intermedia ($280 \mu\text{gL}^{-1}$) se observaron agrupaciones de células sin contenido citoplasmático rodeadas por restos de estructuras celulares y autosporas. No se percibieron diferencias entre las células expuestas a las 24 y 48 h (Fig. 41).

PLOMO ($280 \mu\text{gL}^{-1}$)

24 h de exposición



48 h de exposición

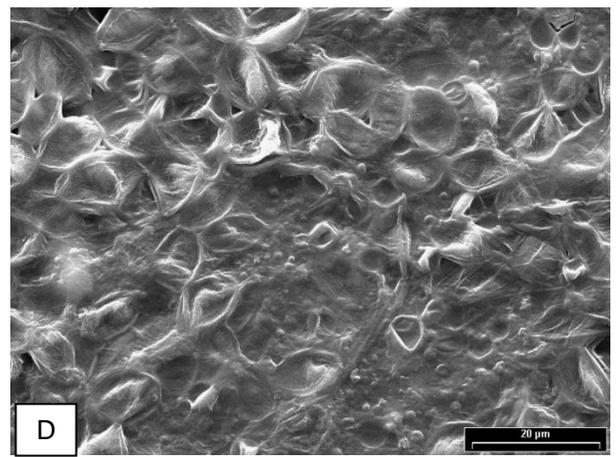
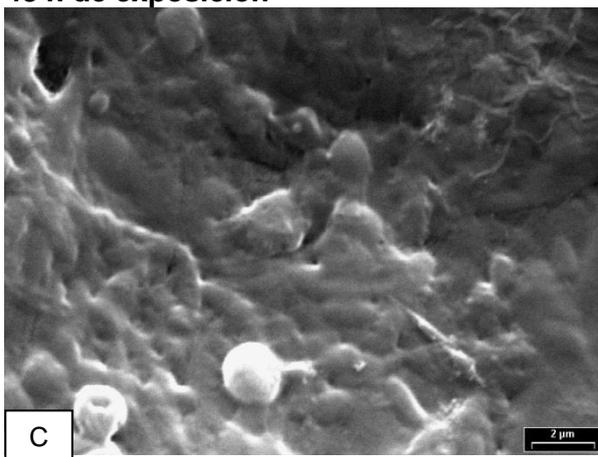
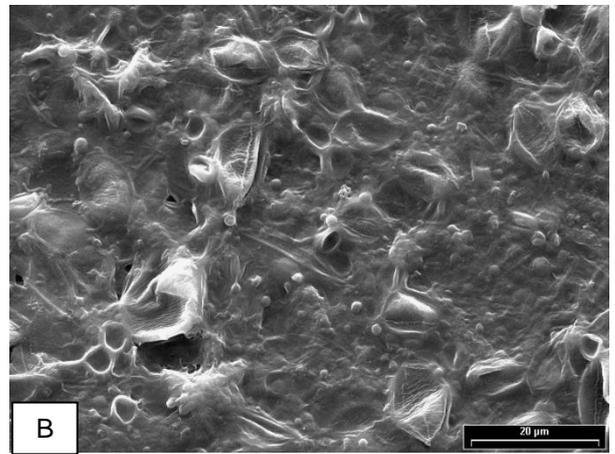
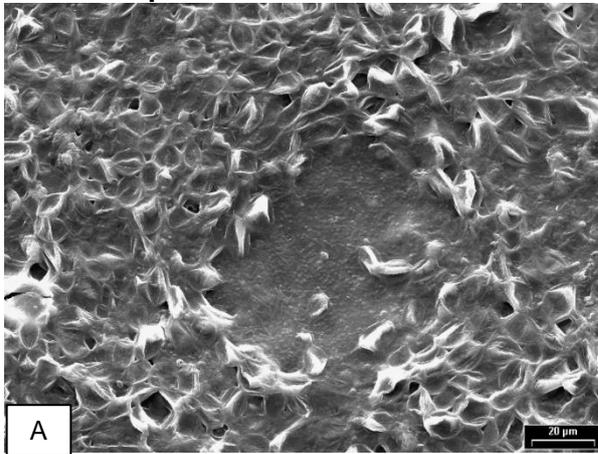


Figura N° 41: Micrografías obtenidas con SEM de células de *C. vulgaris* expuestas a $280 \mu\text{gL}^{-1}$ de Pb durante 24 h (A y B) y 48 h (C y D).

En la concentración más alta ($350 \mu\text{gL}^{-1}$) se observaron células aisladas rodeadas de restos celulares y un mayor número de autosporas libres (Fig. 42).

PLOMO ($350 \mu\text{gL}^{-1}$)

24 h de exposición



48 h de exposición

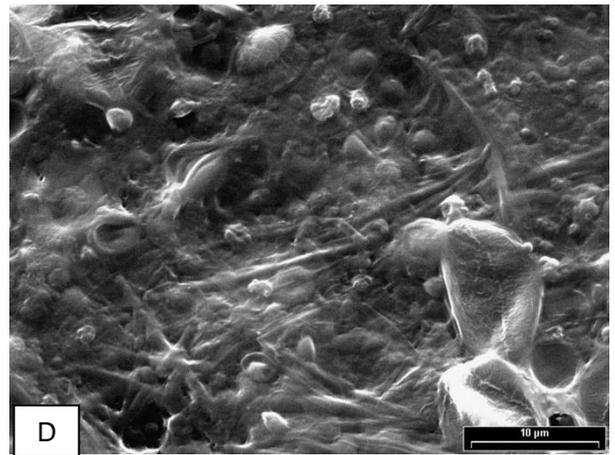
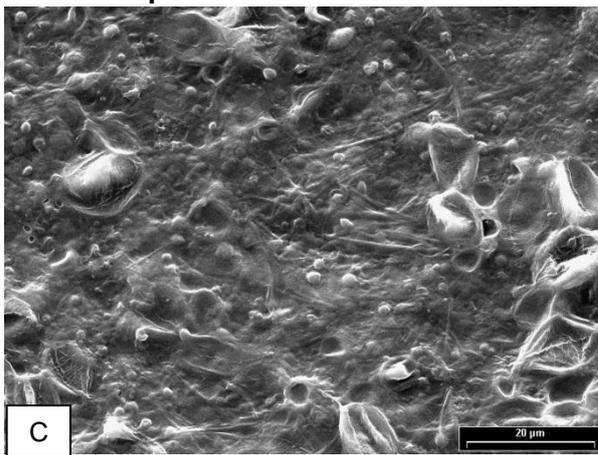


Figura N° 42: Micrografías obtenidas con SEM de células de *C. vulgaris* expuestas a $350 \mu\text{gL}^{-1}$ de Pb durante 24 h (A y B) y 48 h (B y C).

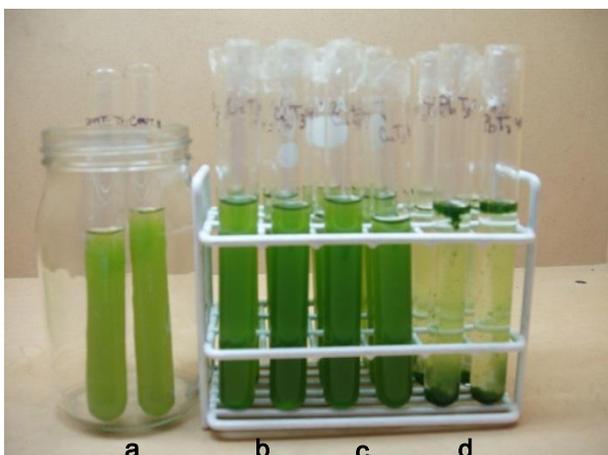
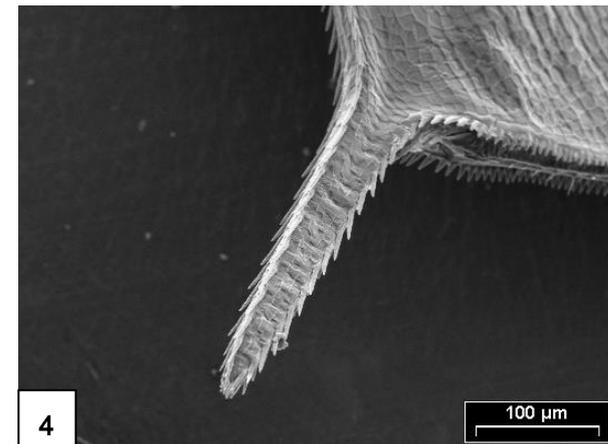
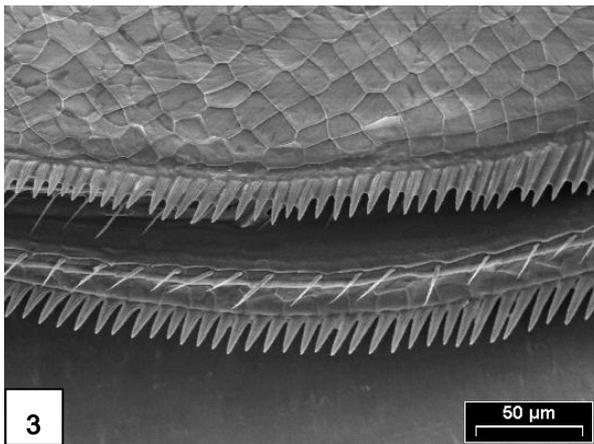
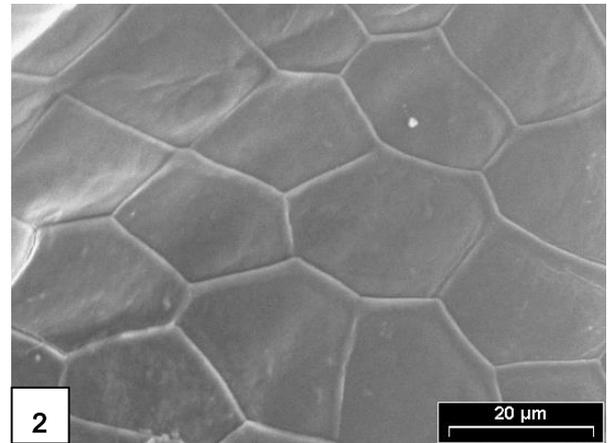
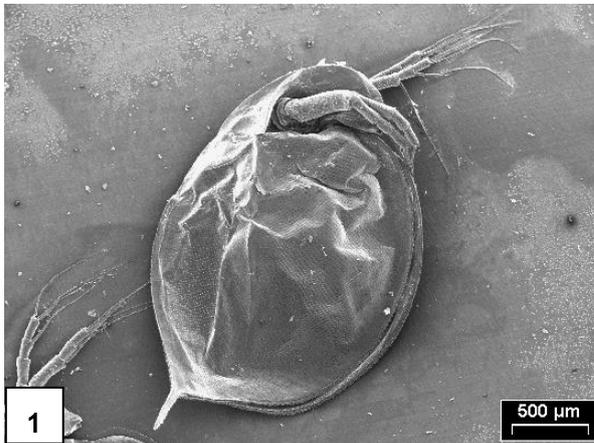
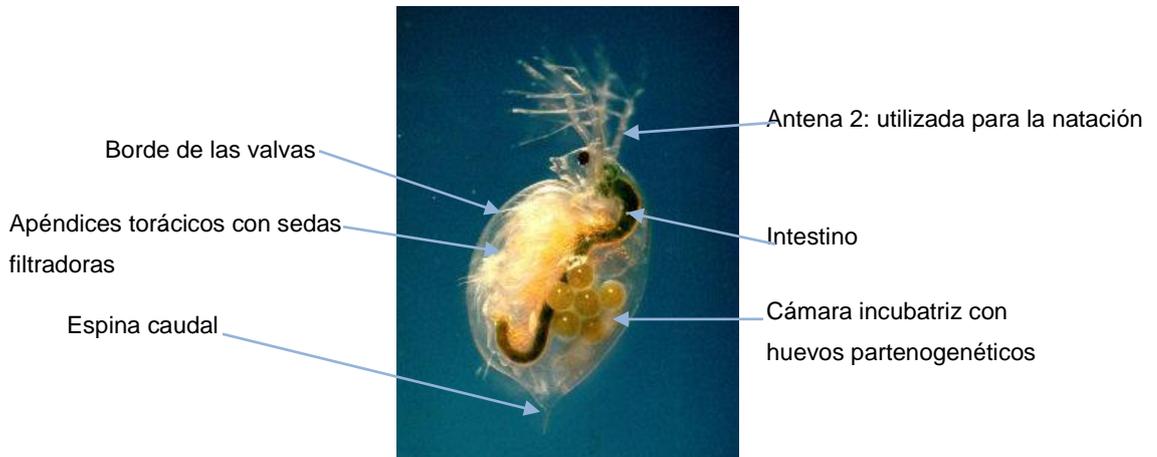
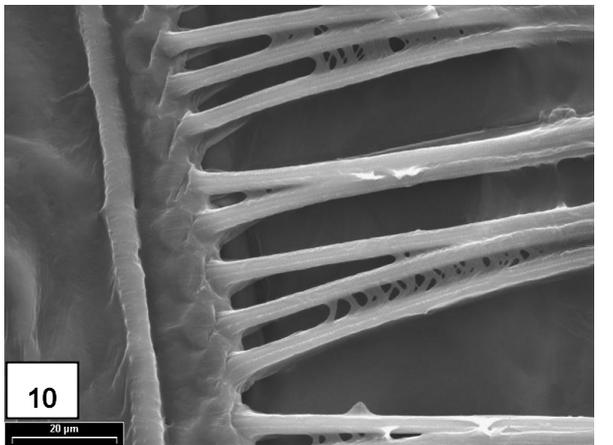
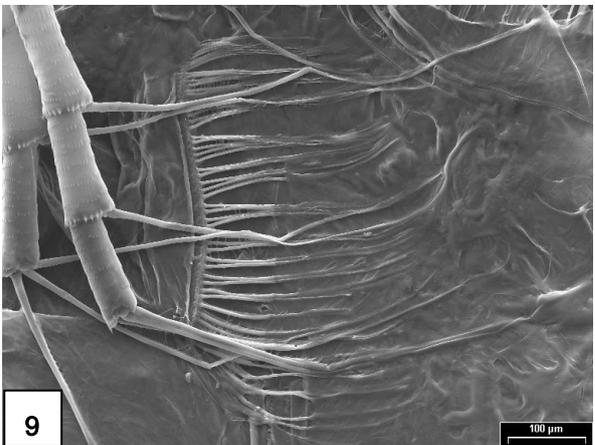
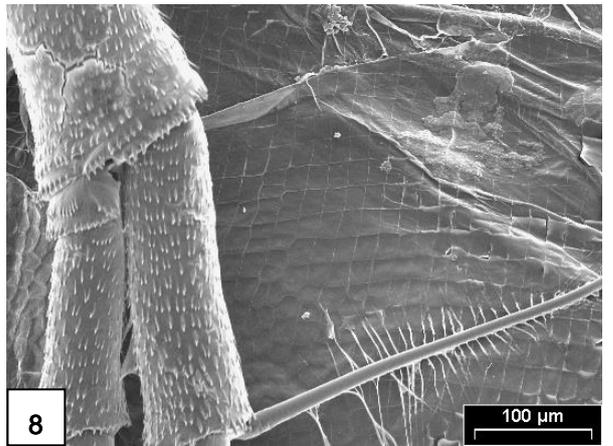
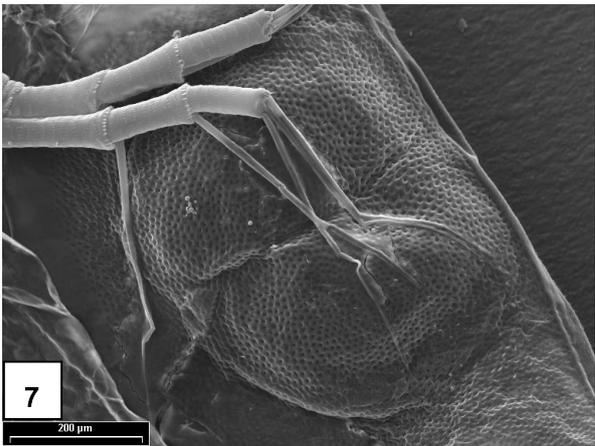
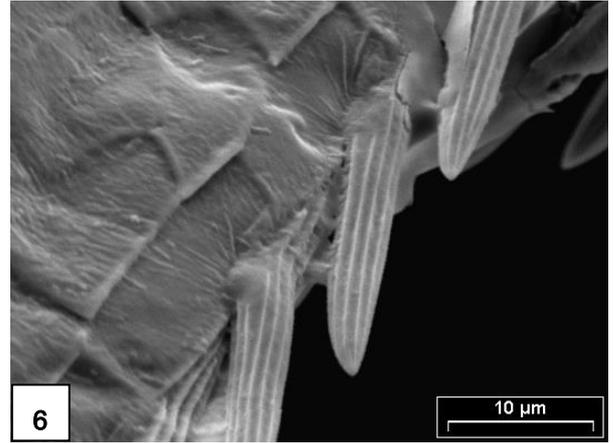
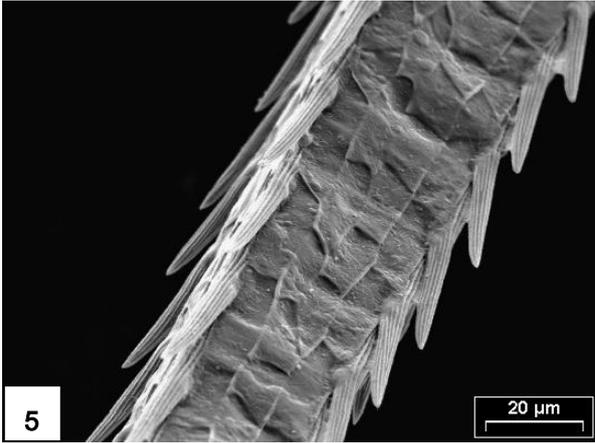


Figura N° 43: En la fotografía se observan visibles diferencias entre el control (a) y las algas expuestas a Cr (b), Cu (c) y Pb (d). Se puede apreciar la formación de flóculos de *C. vulgaris* al estar en contacto con las diferentes concentraciones de Pb.

5.3.3.- *Daphnia magna*. Una aproximación a sus microestructuras con SEM

Se obtuvieron mediante SEM imágenes del exoesqueleto, borde de las valvas, espina caudal, antenas, apéndices y sedas filtradoras, y huevos de resistencia o efiptos de *D. magna*.





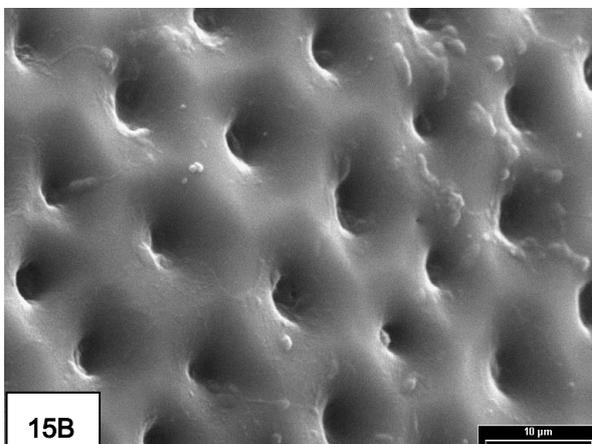
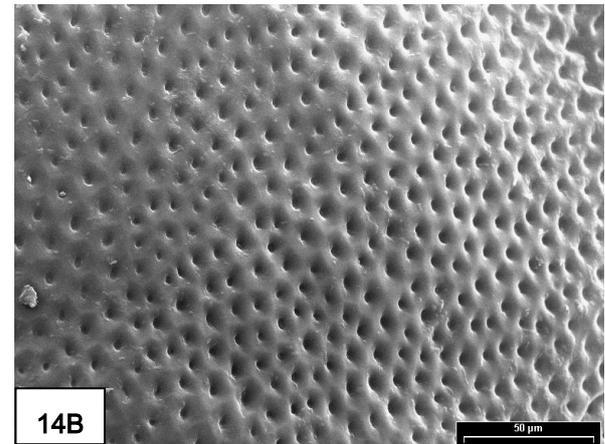
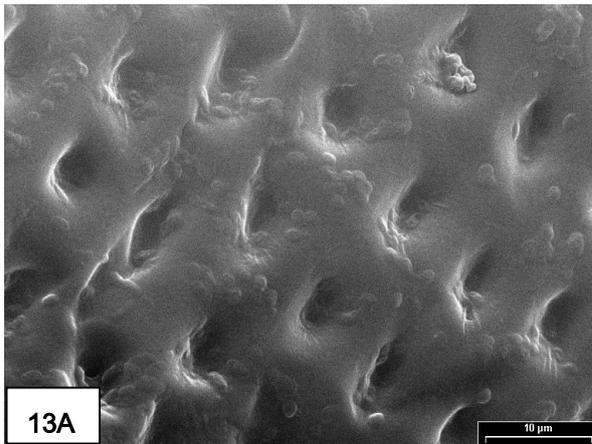
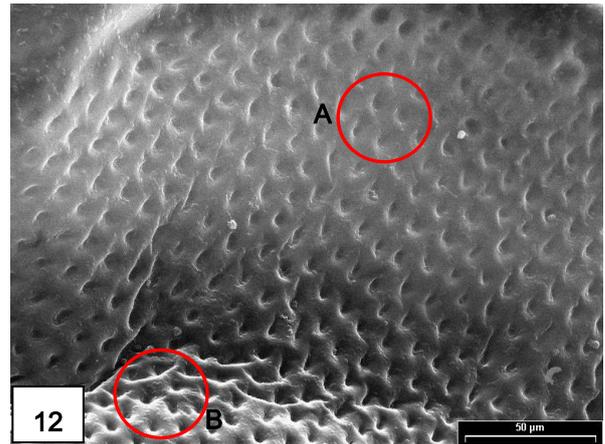
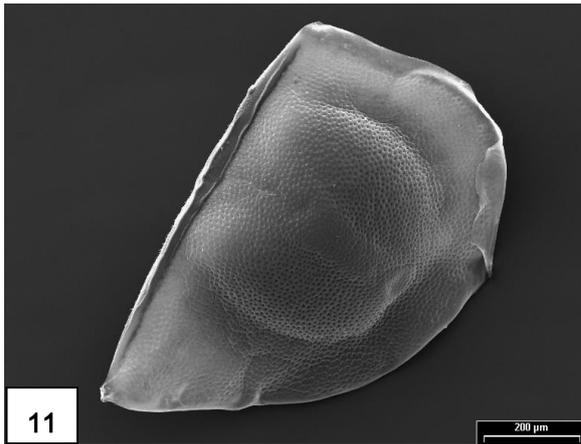


Figura N° 44: Micrografías obtenidas con SEM de *Daphnia magna*: Ejemplar adulto de *D. magna* (1). Exoesqueleto (2). Detalle del borde anterior de las valvas (3). Detalle de la espina caudal (4, 5, 6). Antena 2 sobre efipio (7). Detalle de antena 2 (8). Antena 2 y apéndice torácico (9). Detalle de apéndice torácico con sedas filtradoras (10). Efipio (11). Detalles de la superficie del efipio: región adyacente al embrión (A) y cubierta que rodea al embrión (B) (12, 13, 14 y 15).

6.- DISCUSIÓN PARCIAL

6.1.- Efectos Agudos

En el capítulo anterior se abordó la problemática de la contaminación acuática por metales pesados, As y plaguicidas, empleando como herramientas de análisis parámetros biológicos (riqueza de representantes de la comunidad zooplanctónica) y físicos-químicos, determinantes de la calidad de los ecosistemas acuáticos estudiados. Con los resultados obtenidos en campo pudimos establecer relaciones causales entre distintos componentes del ecosistema acuático, mientras que a través de la realización de ensayos de toxicidad en laboratorio se pudieron analizar los efectos directos que provocan los metales pesados sobre atributos de historia de vida de tres especies de cladóceros.

Cabe aclarar que, a pesar de contar con normativas que regulan los niveles permitidos de diferentes contaminantes en efluentes o desagües cloacales en la Provincia (Ley 11220/1994, Res. 1089/1982, Res. 29/2000; Res. 325/2011), en algunas oportunidades se encontraron concentraciones elevadas de metales pesados en agua ($230.8 \mu\text{gL}^{-1}$, $363 \mu\text{gL}^{-1}$ y $291 \mu\text{gL}^{-1}$, para Cu, Cr y Pb respectivamente) que coincidieron con los registros de mínima riqueza de especies.

Teniendo en cuenta estos resultados, se analizaron a escala de laboratorio los posibles efectos de los metales sobre atributos de historia de vida de cladóceros representativos de la fauna Neotropical y del Litoral Fluvial Argentino. A su vez se compararon estos resultados con los obtenidos en ensayos con *Daphnia magna*, una especie de distribución holártica, que como fuera anteriormente señalado, no forma parte de la fauna de cladóceros neotropicales.

Las herramientas legales anteriormente citadas son fundamentadas considerando, además de los caudales receptores, los valores guías propuestos a nivel nacional e internacional que refieren a las concentraciones máximas de diferentes contaminantes permitidos para la protección de la vida acuática. A partir de la realización de ensayos de toxicidad aguda y crónica, realizados desde principios de siglo XX, se obtuvieron las concentraciones letales o efectivas (LC_{50} ; EC_{50}) y las concentraciones de efecto mínimo y de efecto no observables (en inglés denominadas: LOEC (Lowest Observed Effect Concentration) y NOEC (No Observed Effect Concentration), cuyos valores fueron luego considerados por las agencias internacionales para establecer los niveles guía para la protección de la biota acuática (OECD 1981, EPA 1984, APHA 1989) (Gutiérrez y Gagneten, 2011). En este sentido, los responsables de fijar las normas canadienses tuvieron en cuenta al crear el nivel guía para Cr^{+6} los valores de LOEC obtenidos a partir de ensayos realizados con *C. dubia*, derivado de multiplicar este valor ($\text{LOEC}: 0.01 \text{ mgL}^{-1}$) (Hickey, 1989) por un factor de 0.1 (CCME, 1991). Entre los representantes del zooplancton tanto esta última especie como *D. magna* son los más empleados, aunque otras menos estudiadas, como *M. macleayi* se proponen como posibles de ser empleados en

bioensayos porque presentan una alta sensibilidad, amplia distribución geográfica y son representativas de la fauna regional.

Los metales reglamentados usualmente son los presentes en efluentes de una amplia variedad de industrias en todo el mundo. Los niveles guías permitidos para la protección de la biota acuática (aplicable a agua dulce) según la Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación Argentina (2003 y 2005 a b) son ≤ 6.6 , ≤ 2.5 y $\leq 1.59 \mu\text{gL}^{-1}$ para el Cu, Cr y Pb, respectivamente. En el presente trabajo los ensayos agudos demostraron un orden de toxicidad dado por $\text{Cu} > \text{Cr} > \text{Pb}$ para las tres especies estudiadas (Tabla 5). Debe destacarse, que los límites establecidos para el Pb son similares o aún más estrictos que para el Cu y Cr, pero éstos últimos mostraron ser los más tóxicos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores en trabajos previos, que afirman que el Cu debido a su elevada solubilidad en fluidos orgánicos y facilidad de absorción a través de membranas biológicas (Sylva, 1975) resultó ser el más tóxico de los metales para especies acuáticas inferiores (Repetto, 1995), especialmente para los organismos planctónicos (Sullivan y col., 1983; Sunda y col., 1987; Wong y Pak 2004; Gutiérrez y col., 2010).

Según lo observado en estudios previos, la baja toxicidad del Pb obtenida en este trabajo posiblemente esté relacionada con los altos valores de dureza del medio sintético. Chapman y col., (1980) analizaron la relación existente entre los efectos tóxicos y la dureza, y encontraron que para *D. magna* la sensibilidad disminuyó a medida que ésta se incrementó, obteniéndose una CL_{50} de $612 \mu\text{gL}^{-1}$ y $1910 \mu\text{gL}^{-1}$ para una dureza de 54 mg y 152 mg $\text{CaCO}_3\text{L}^{-1}$ respectivamente, llegándose a obtener valores máximos (CL_{50} : $31650 \mu\text{gL}^{-1}$) cuando fue igual a 206 mg $\text{CaCO}_3\text{L}^{-1}$. En la presente tesis, la CE_{50} (48 h) registrada para *D. magna* fue de $2.953 \mu\text{gL}^{-1}$ (2.062-3.759), para una dureza esperada de 160-180 mg $\text{CaCO}_3\text{L}^{-1}$, según APHA (1998) (Tabla 5). Aparentemente, el efecto de la dureza se debe principalmente al hecho de que el Pb^{+2} sería incorporado desde el medio sintético como un análogo metabólico del ion calcio (Markich y Jeffree, 1994). Por lo tanto, la concentración de este elemento en el medio, sería el responsable de la disminución de la toxicidad del Pb. No obstante, los datos disponibles no permiten cuantificar apropiadamente la relación existente entre ambas variables. También es importante considerar la relación entre la toxicidad del Pb y el pH (Schubauer-Berigan y col., 1993, Gerhardt, 1994, Stouthart y col., 1994), encontrándose en todos los casos un aumento de ésta a medida que el pH disminuye.

El orden de sensibilidad de las tres especies para Cu y Cr fue *C. dubia* > *D. magna* > *M. macleayi*, mientras que en el caso del Pb: *C. dubia* > *M. macleayi* > *D. magna*. A su vez, las CE_{50} disminuyeron con el incremento en el tiempo de exposición (Tabla 5). Estos valores también fueron tenidos en cuenta para determinar las concentraciones subletales que se utilizaron posteriormente en los ensayos de ciclo de vida.

Con respecto a la sensibilidad de *D. magna*, estudios previos registraron CE_{50} con valores entre 1,4 y 210 μgL^{-1} para cobre, entre 60 a 410 μgL^{-1} para cromo (Winner y Farrel, 1976; Dave, 1984; Ewell y col., 1986; Khangarot y Ray, 1989; Persoone y col., 1989; Fargasova 1994), y entre 0.15 y 4.92 mgL^{-1} para Pb (LeBlanc, 1982; Elendt y Bias, 1990; Seco Gordillo y col., 1998, Ahmet y col. 2008). Se observa que tanto para cobre como para cromo, los valores obtenidos en este trabajo fueron cercanos al límite inferior para el Cu, y considerablemente más bajos para el Cr (12 y 40 μgL^{-1} , respectivamente), aunque similares a los registrados por Gutierrez y col. (2012). Mientras que para Pb la CE_{50} se encuentra en el rango citado con anterioridad (2.95 mgL^{-1}) (Tabla 5).

En ensayos con *C. dubia* se registraron valores de CE_{50} (48 h) para cromo de 144 μgL^{-1} (Spehar y Fiandt, 1986), mientras que para cobre entre 27 y 79 μgL^{-1} (Belanger y col., 1989, Gutierrez y col., tesis 2012). Gagneten y Vila (2001) observaron valores inferiores que variaron en relación al pH del medio (de 5 a 20 μgL^{-1}). Para el Pb, los rangos encontrados en estudios previos fueron de 32.8 a 258.3 μgL^{-1} (Spehar y Fiandt, 1986; Masters y col., 1991; Diamond y col., 1997). En la presente tesis, las concentraciones efectivas registradas a las 48 h para cromo y cobre se encontraron por debajo del rango de toxicidad expuesto anteriormente (28 y 7 μgL^{-1} , respectivamente), mientras que en el caso del plomo fue superior (343 μgL^{-1}). A su vez, se obtuvieron los siguientes valores promedios de pH para Cu, Cr y Pb: 7,53 ($\pm 0,19$), 7,6 ($\pm 0,09$) y 7,22 ($\pm 0,42$) respectivamente (Tabla 6).

Los efectos de metales pesados sobre el ciclo de vida de *M. macleayi* fueron escasamente estudiados, en este sentido se encontraron trabajos donde evaluaron la toxicidad del uranio y el cadmio (Bywater y col., 1991; Semaan, 1999; Semaan y col., 2001; Antunes y col., 2007), aunque no de los metales analizados en la presente tesis.

Es importante considerar la discordancia encontrada en los valores de CE_{50} documentados por diferentes autores (Baudouin y Scoppa, 1974; Khangarot y Ray, 1989; Seco Gordillo y col., 1994; Ahmet y col., 2008, entre otros), lo que demuestra la necesidad de seguir rigurosamente pautas metodológicas estandarizadas de ensayos y cultivos stock de cladóceros, con el fin de reducir la variabilidad en los resultados. Las diferencias pueden ser atribuidas a la especie química del elemento a ensayar (Khangarot y Ray, 1989), a la composición del medio sintético y a las condiciones del cultivo (Seco Gordillo y col., 1994), ya que estos organismos producen neonatos más o menos resistentes dependiendo de las variables ambientales donde son cultivados. Al respecto, Enserink y col. (1993) sostuvieron que las condiciones del medio donde se cultivó a *D. magna* influyeron directamente en la sensibilidad que presentaron los neonatos al ser expuestos a cromo y cadmio.

Por otro lado, Barata y col. (1998), afirmaron que las respuestas agudas fueron más variables cuando se estudiaron efectos con metales no esenciales. Los metales esenciales forman parte de componentes estructurales, proteínas enzimáticas y participan en el balance

de electrolitos, mientras que no se conoce específicamente las funciones que cumplen los metales no esenciales. Según Mason y Jenkins (1995), es probable que la toxicidad esté más relacionada con la demanda y uso que con propiedades fisicoquímicas. En este sentido, los metales esenciales están sujetos a una continua selección direccional, mientras que los no esenciales son adquiridos por selección discontinua.

Finalmente destacamos que si bien la mayoría de los trabajos que evalúan la toxicidad de metales pesados se centran en el uso de las especies *D. magna* y *C. dubia*, dejando áreas vacantes en el conocimiento relacionadas con la sensibilidad de especies representativas de cada región en particular (Gutiérrez y Gagneten, 2011), estudios recientes comenzaron a focalizarse en organismos test diferentes a los comúnmente empleados, entre ellos: *Daphnia similis*, *Leptodora kindtii* y *Diaphanosoma brachyurum* (Rodgher y col., 2010; Sakamoto, Masaki y col., 2010; Hiroyuki Mano, y col., 2011). Coincidiendo con Freitas y Rocha (2011), sostenemos que existe una creciente necesidad de realizar investigaciones que enfatizen en las respuestas de especies nativas a contaminantes encontrados comúnmente en los sistemas acuáticos regionales, lo cual proporcionaría conocimientos relevantes desde el punto de vista biológico y ecológico.

6.2.- Efectos sobre atributos de historia de vida

En los ensayos crónicos con cobre todos los atributos de historia de vida analizados en *D. magna* mostraron diferencias significativas cuando fueron comparados con el control, incluso en la concentración menor empleada ($20 \mu\text{gL}^{-1}$) (Tabla 7). Untersteiner y col., (2003) observaron que concentraciones aún inferiores de Cu ($10 \mu\text{gL}^{-1}$) provocaron alteraciones en los patrones de natación. Contrariamente, *D. magna* mostró cierta tolerancia a las concentraciones más bajas de cromo y plomo (5 y $30 \mu\text{gL}^{-1}$, respectivamente) ya que no se encontraron diferencias significativas en la sobrevivencia, el número de neonatos y mudas cuando fueron comparadas con el control (Tabla 7). Munzinger y Monicelli (1992) demostraron que después de 21 días de exposición a $5 \mu\text{gL}^{-1}$ de Cr, las hembras adultas de *D. magna* tuvieron neonatos resistentes a dicho metal, obteniéndose mayor sobrevivencia y fecundidad que en los controles.

El número de hembras de las tres especies de cladóceros que alcanzaron la madurez sexual se redujo con el incremento en la concentración de Cu, Cr y Pb (Tabla 8). Por otra parte, se encontraron diferencias significativas entre controles y tratamientos en la sobrevivencia de *M. macleayi* cuando fue expuesta a concentraciones de Cu inferiores a las empleadas en los test con *D. magna* ($15 \mu\text{gL}^{-1}$), y concentraciones aún menores ($5 \mu\text{gL}^{-1}$) afectaron significativamente la fecundidad y el crecimiento (Tabla 7). En esta especie, la edad de la primera reproducción se retrasó en las concentraciones intermedias y superiores de Cu y Cr, y en todos los tratamientos con Pb. Luego de ser expuesta a estos dos últimos metales, muy

pocas hembras de *M. macleayi* alcanzaron la madurez sexual, aunque en tiempos similares a los registrados en el control (Tabla 8).

Resulta evidente que al analizar y discutir sobre la sensibilidad de una especie es necesario tener en cuenta no sólo los efectos agudos, sino que es importante considerar además las respuestas subletales inducidas por concentraciones inferiores, capaces de producir alteraciones a largo plazo. En este sentido, los test agudos permitieron reconocer y evaluar los efectos de los metales pesados en un período de exposición corto (24 y 48 h) y, si bien éstos demostraron que *D. magna* es más sensible al Cr y al Cu que *M. macleayi* (Dm CE₅₀ 48 h: 40 µgL⁻¹ y 12 µgL⁻¹ para Cr y Cu; y Mm CE₅₀ 48 h: 91 µgL⁻¹ y 37 µgL⁻¹ para Cr y Cu), los ensayos crónicos (15 días) mostraron lo contrario, sobre todo en el caso del Cr. Al analizar los efectos sobre la fecundidad y el crecimiento se pudo observar que éstos parámetros fueron afectados significativamente cuando *M. macleayi* fue expuesta a 5 µgL⁻¹ de Cr, resultados contrarios a los obtenidos para *D. magna*. Con respecto a los ensayos con Cu, en *M. macleayi* se observaron efectos adversos sobre el crecimiento y la fecundidad cuando se expuso a 5 µgL⁻¹ y en la sobrevivencia cuando la concentración fue de 15 µgL⁻¹. Consideramos importante destacar que las respuestas subletales de *D. magna* no fueron evaluadas para estas concentraciones, sino que se trabajó con concentraciones más elevadas (20, 40 y 60 µgL⁻¹). Posiblemente, *M. macleayi* asignó recursos energéticos a la sobrevivencia (tanto en ensayos agudos como crónicos), pero no al crecimiento y reproducción. Al respecto, Sibly y Calow (1989) en Forbes y Calow (1996), postulan que puede establecerse un compromiso entre la capacidad de sobrevivir al tóxico y la tasa de crecimiento y fecundidad.

En cuanto a la sensibilidad de *C. dubia*, tanto el Cr como el Pb afectaron significativamente todos los atributos analizados (Tabla 7). Con respecto al Cu, se utilizaron concentraciones aún menores (2.5, 5 y 10 µgL⁻¹), registrándose diferencias significativas en la sobrevivencia y el crecimiento cuando se comparó el control con C2 y C3, y en la fecundidad entre el control y C3 (Tabla 7). A su vez cuando *C. dubia* fue expuesta a la menor concentración de Pb (30 µgL⁻¹), sólo un representante logró alcanzar la madurez sexual en un tiempo significativamente diferente al del control, mientras que en C2 (90 µgL⁻¹) y C3 (270 µgL⁻¹) no se registraron neonatos.

Considerando los resultados obtenidos en los ensayos crónicos, 20 µgL⁻¹ de Cu en agua afectaron la sobrevivencia, fecundidad y crecimiento en *D. magna*, aunque no retrasó su madurez sexual. Concentraciones menores -15 µgL⁻¹- afectaron todos los atributos de historia de vida de *M. macleayi*, incluso sólo una hembra alcanzó la madurez sexual 3 días posteriores a lo registrado en los controles. Concentraciones aún menores de Cu -10 µgL⁻¹- afectaron significativamente la fecundidad y madurez sexual de *C. dubia*, mientras que cuando fueron expuestas a 5 µgL⁻¹ la sobrevivencia y el crecimiento mostraron ser los atributos más afectados (Tablas 7 y 8).

Con respecto a la toxicidad del Cr, en tratamientos con $25 \mu\text{gL}^{-1}$ se vieron afectadas la sobrevivencia y la madurez sexual de *D. magna*, mientras que concentraciones inferiores $-15 \mu\text{gL}^{-1}$ mostraron efectos negativos significativos sobre la fecundidad y el crecimiento. Dicha concentración afectó además la sobrevivencia y madurez sexual en *M. macleayi*, mientras que cuando se expusieron a $5 \mu\text{gL}^{-1}$ se observaron efectos adversos sobre la fecundidad y el crecimiento. En *C. dubia* todos los atributos estudiados fueron afectados significativamente cuando se expusieron a $5 \mu\text{gL}^{-1}$ (Tablas 7 y 8).

En *D. magna* se observaron efectos adversos significativos sobre los atributos analizados cuando fueron expuestas a $90 \mu\text{gL}^{-1}$ de Pb. Mientras que concentraciones menores $-30 \mu\text{gL}^{-1}$ afectaron todos los parámetros analizados en las dos especies representativas del LFA (Tablas 7 y 8).

Además, a partir de los resultados obtenidos en test crónicos, pudimos registrar cómo los costos metabólicos adicionales para un organismo por vivir en un medio acuático con condiciones adversas, ocasionan una reasignación de recursos energéticos a procesos importantes para la sobrevivencia y el crecimiento poblacional, tal como lo comunicado por Beyers y col. (1999). En los ensayos con Cu la fecundidad de *D. magna* se incrementó entre los días 10 y 12 (en C1), período en el cual el crecimiento disminuyó. Respuestas similares se observaron en *M. macleayi* y *C. dubia* entre los días 11-15 y 11-13 (en C2), respectivamente (Figs. 26 y 27).

Según lo indicado por Forbes y Forbes (1994) los organismos pueden mantener funciones reproductivas a expensas del crecimiento. En este sentido registramos que en los ensayos con la menor concentración de Cr, *D. magna* incrementó su fecundidad progresivamente a partir del día 8 hasta finalizar el ensayo, período en el cual su crecimiento disminuyó. El número de neonatos de *M. macleayi* se incrementó en todas las concentraciones de Cr ensayadas desde el día 13 al 15, y el crecimiento disminuyó o se mantuvo constante (en C2), resultados similares se obtuvieron para *C. dubia* (en C2). Ésta especie expuesta a Pb se reprodujo sólo en la menor concentración al concluir el ensayo, momento en el cual también disminuyó el crecimiento. Contrariamente, *D. magna* expuesta a Cu (en C2 y C3) y Pb (en C1), y *C. dubia* a Pb (en C2) demostraron una asignación de recursos al crecimiento pero no a la reproducción (Figs. 26 y 27).

Los resultados obtenidos proporcionaron información relevante sobre las respuestas de especies representativas del LFA ante la presencia de metales pesados registrados comúnmente en nuestros sistemas acuáticos. Un incremento en las concentraciones de Cu, Cr y Pb produjo efectos tóxicos directos sobre la sobrevivencia, fecundidad, madurez sexual y crecimiento, principalmente en las especies regionales, por lo tanto *D. magna* ha demostrado ser menos sensibles. Estos resultados confirman la cautela que se debe tener al extrapolar al

hemisferio sur, los resultados obtenidos sobre la sensibilidad de especies holárticas propuestas como referentes para establecer los niveles guía en el hemisferio norte.

Las diferentes respuestas encontradas entre las especies estudiadas posiblemente se deban a estrategias relacionadas con la absorción, la distribución, la interacción con biomoléculas, el almacenamiento o la eliminación de los metales. También otros factores tales como las relaciones taxonómicas y procesos relacionados con la capacidad de aclimatación/adaptación a un entorno determinado, pueden explicar dichas diferencias (Bossuyt y Janssen 2005). En varias comparaciones interespecíficas Takahashi y col. (1987), Vesela y Vijverberg (2007), demostraron que los dáfnidos de mayor tamaño fueron menos sensibles a las sustancias tóxicas que las especies de zooplancton más pequeñas. Resultados similares se obtuvieron en este trabajo.

Finalmente, a continuación se presentan los criterios más relevantes a considerar para la selección de una especie de cladóceros representativo de nuestros sistemas acuáticos en pruebas de toxicidad: (I) baja sensibilidad a la manipulación; (II) la producción de un gran número de neonatos que presenten mínima variabilidad en las respuestas para aumentar la precisión de los resultados; (III) un ciclo de vida corto con elevada tasa de reproducción para minimizar el tiempo y el costo; (IV) un tamaño adecuado para facilitar la manipulación y observación; (V) tolerancia a los parámetros físicos y químicos característicos de los medios sintéticos estandarizados (por ejemplo, dureza del agua), y (VI) una alta sensibilidad a los contaminantes de interés (Lopes y col., 2011). Estos criterios fueron cumplidos por *M. macleayi* y *C. dubia*, por lo que insistimos en la importancia de trabajar con especies nativas como bioindicadores de la contaminación por metales de los sistemas que conforman el LFA y otras regiones de América del Sur donde se distribuyen dichas especies.

6.3.- Aplicación de microscopía electrónica de barrido y microanálisis XEDS

El empleo del microscopio electrónico (SEM) nos permitió conocer y revelar modificaciones de la morfología de *Chlorella vulgaris* cuando fue expuesta a metales pesados, también nos permitió aproximarnos y conocer detalles de características estructurales de *D. magna*. Pudimos además establecer posibles relaciones causales entre los cambios observados en procesos biológicos a niveles de organización superiores (poblacional, comunitario), con alteraciones morfológicas registradas a nivel de organismos.

En estudios previos, realizados en campo y laboratorio, se registraron efectos negativos de metales pesados sobre procesos biológicos en poblaciones experimentales de cladóceros y en la comunidad zooplanctónica de la cuenca del río Salado inferior (Gagneten, 2002; Gagneten y Ceresoli, 2004). Las modificaciones registradas en *C. vulgaris* indicarían que los daños en el recurso trófico podrían en parte ser causa de los efectos adversos detectados en las poblaciones zooplanctónicas estudiadas.

En función de los resultados obtenidos se observó a partir de SEM que en el control las células de *C. vulgaris* no sufrieron modificaciones manteniendo su forma esférica (Fig. 34) en tanto que las microalgas expuestas a metales mostraron desorganización de su estructura, pudiendo observarse restos de membranas, fragmentos celulares y autosporas libres hecho que seguramente repercute en el ciclo de vida de *C. vulgaris* (Fig. 35 - 42).

Además, en el momento en que las algas se mezclaron con la solución de $(\text{NO}_3)_2 \text{Pb}$ se pudo apreciar la formación de flóculos (Fig. 43). El proceso de floculación hace referencia a la separación de la masa algal del medio de cultivo, con adhesión de células, los cuales pueden sedimentar o permanecer flotando en la superficie, condición que impide el crecimiento algal. Este fenómeno puede ser espontáneo, o bien producirse por factores ambientales como ser cambios en el pH, precipitación celular por Mg, Ca, fosfatos y carbonatos, o inducida por agentes químicos. Muchos compuestos son conocidos como eficientes floculantes de microalgas: sulfato de aluminio, cal, hierro y sulfato férrico, entre otros (Richmond, 1986). Si bien, según la bibliografía consultada, no se hallaron datos que mencionen al $(\text{NO}_3)_2 \text{Pb}$ como agente floculante de *C. vulgaris*, en nuestro trabajo se observó que podría serlo, al menos para las concentraciones aquí ensayadas.

En cuanto a los resultados obtenidos con microscopía electrónica de barrido y la técnica de microanálisis XEDS (X rays energy dispersive spectrometry) podemos concluir que si bien se registró la presencia de Cr, Cu y Pb en *D. magna* y *C. vulgaris*, no se pudieron realizar cuantificaciones ni determinar zonas de depósito mediante esta técnica ya que las concentraciones registradas fueron cercanas al límite de detección del equipo. Según Font y col., (1998) esta técnica permite realizar un análisis semicuantitativo con una dispersión del 30 %. Los elementos registrados por SEM-XEDS en concentraciones inferiores a 0,5 % de peso atómico (Wt%) se encuentran en el límite de detección, por lo tanto no pueden ser cuantificados de manera acertada. Condición que además depende del elemento que se analice, de la superficie irradiada y de la homogeneidad de las muestras.

A pesar de las ventajas que presenta la aplicación de técnicas que combinan microscopía electrónica con microanálisis en muestras biológicas, son escasos los trabajos donde la utilicen. Entre ellas podemos mencionar: (i) es sensible a todas las formas de metal, incluyendo aquellos unidos a metaloproteínas o gránulos, (ii) se aplica fácilmente en organismos que son demasiado pequeños para diseccionar; y (iii) el uso de secciones sagitales de animales enteros permite la comparación simultánea de distribuciones de metal en la mayoría de los órganos (Craig y col., 1998; De Samber y col., 2008). Se han encontrado estudios donde se aplican para la determinación y distribución de metales en macrófitas (Suñe y col., 2007; Rabier y col., 2008) y mamíferos (Donnadieu-Claraz y col., 2007).

En este contexto, Siao y col. (2007) utilizaron SEM y XEDS para confirmar la presencia de Cu y analizar el mecanismo de absorción y/o adsorción de este metal en *Chlorella sorokiniana*,

Anabaena laxa y *Hapalosiphon welwitschii*. Estos autores expusieron las microalgas a 150 mgL^{-1} de Cu y confirmaron por medio de los espectros obtenidos que este metal se encontraba limitado a sus superficies, y aunque estos fueron utilizados con fines cualitativos, los porcentajes de Cu hallados correspondieron a sus capacidades relativas de fijar este metal por adsorción a las células. Han y col., (2006) analizaron la performance de *Chlorella miniata* para secuestrar Cr^{+3} a partir de soluciones enriquecidas con 100 mgL^{-1} durante 24 h, concluyendo que la morfología de las células se vio modificada luego de adsorber el metal a su superficie, observándose partículas y agrupaciones densas relacionadas a la misma.

Como puede apreciarse las concentraciones a las que estos autores expusieron las microalgas fueron marcadamente superiores a las utilizadas en este trabajo. Nosotros decidimos emplear cantidades de Cr, Cu y Pb iguales para algas y cladóceros con el fin de poder establecer comparaciones en cuanto a la acumulación y toxicidad en ambos organismos. A su vez, nos propusimos ensayar concentraciones ambientalmente relevantes, o sea rangos registrados en los sistemas acuáticos estudiados (Capítulo I) y compatibles con el mantenimiento de cultivos estables de cladóceros.

En el presente capítulo, además de mostrar los efectos de metales sobre el ciclo de vida de *D. magna*, se ampliaron los conocimientos en cuanto a características estructurales de esta especie. De esta manera, el uso del SEM permitió observar ejemplares adultos de *D. magna*, antenas, valvas, apéndices torácicos, sedas filtradoras, y huevos de resistencia o efipios. Con el avance en técnicas de microscopía electrónica, desde la década del 80', se vienen describiendo con detalles cada vez más minuciosos estas estructuras y sus respectivas funciones (Watts y Petri, 1981; Geller y Muller, 1981). Las características estructurales de los efipios han sido descritas por Wolff (1904) y Zwack (1905), mientras aspectos ultraestructurales de su morfología fueron abordadas por Schultz en el año 1977, quién observó numerosas hendiduras en la superficie externa distribuidas al azar que se forman por el engrosamiento de la cutícula de la cámara de cría.

Las micrografías tomadas con SEM de los efipios en desarrollo (Figs. 30 y 32) y los espectros de energía obtenidos a partir de microanálisis (Figs. 31 y 33) mostraron que las concentraciones de Cr fueron superiores sobre el embrión ($y > 0.5 \text{ \% Wt}$) cuando se la comparó con la presente en la cubierta adyacente. En los efipios de *D. magna* expuesta durante 48 h a $150 \text{ }\mu\text{gL}^{-1}$ y $280 \text{ }\mu\text{gL}^{-1}$ de Cr se obtuvieron los siguientes porcentajes de peso atómico: 1.67 \% Wt y 2.35 \% Wt , respectivamente, ambos correspondientes a la zona que contenía el embrión, mientras que no se registró Cr en la cubierta adyacente (Tablas 11 y 12). Como puede apreciarse, dichas concentraciones guardaron una relación directa con el incremento de Cr presente en el medio de cultivo. Las mismas podrían producir efectos genotóxicos en los embriones que allí se encuentran alojados. En este sentido, trabajos llevados a cabo por Coors y col., (2009) afirman que la incorporación de contaminantes de

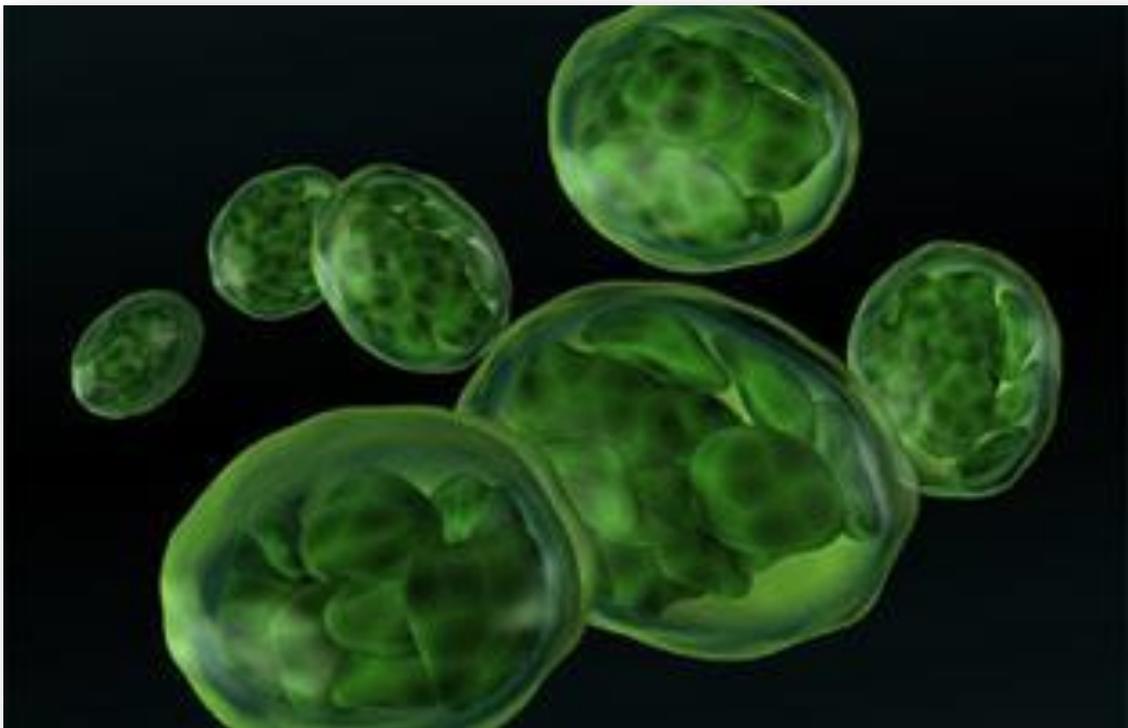
origen antrópico, entre ellos el dicromato de potasio ($\text{Cr}_2\text{O}_7\text{K}_2$) a los sistemas acuáticos generan gradientes ambientales que imponen presiones de selección local, generando efectos genotóxicos en las poblaciones de dáfnidos allí presentes.

A su vez, la aplicación de estas técnicas nos permitió conocer los porcentajes atómicos de los elementos constitutivos de *D. magna*. En este sentido, tanto en el exoesqueleto como en los efipios el elemento mejor representado fue el calcio (Ca). Resultados similares obtuvieron De Samber y col. (2008) empleando técnicas de microfluorescencia (scanning X-ray microfluorescence). Este elemento se encuentra asociado principalmente con carbonato y fosfato mineral, brindándole rigidez y consecuentemente mayor protección contra depredadores. A su vez en el exoesqueleto el Azufre (S) estuvo representado en concentraciones inferiores a las registradas en efipios, donde fue el segundo elemento más abundante. A continuación se muestran en orden decreciente parte de los elementos y sus porcentajes atómicos registrados en el exoesqueleto de *D. magna*: Ca (42.03 - 43.69 Wt %) > P (19.83 - 21.04 Wt %) > S (9.99 - 10.43 Wt %) > Na (7.77 - 10.8 Wt %); en el efipio expuesto a $150 \mu\text{gL}^{-1}$: Ca (34.49 Wt %) > S (30.31 Wt %) > P (21.47 Wt %) > K (5.08 Wt %); y por último en el efipio expuesto a $280 \mu\text{gL}^{-1}$: Ca (44.01 Wt %) > S (26.65 Wt %) > P (12.84 Wt %) > Na (8.26 Wt %) (Tablas 9, 10 y 11).

Podemos concluir que los metales empleados además de influir en las poblaciones experimentales de cladóceros afectando su ciclo de vida, ocasionaron modificaciones morfológicas y lisis celular en su recurso trófico. La alteración en estos eslabones clave de las tramas tróficas de los sistemas acuáticos continentales, podría repercutir negativamente en poblaciones naturales de organismos planctónicos, y a su vez sobre poblaciones de peces cuyas larvas y juveniles se alimentan de organismos zooplanctónicos.

CAPÍTULO III

Empleo de microalgas en aplicaciones biotecnológicas de remediación y efecto de xenobióticos sobre su crecimiento



- **Materiales y Métodos**
- **Resultados**
- **Discusión parcial**

4.- MATERIALES Y METODOS

4.1.- Condiciones de cultivo de *Chlorella vulgaris*

Chlorella vulgaris (Beijerinck Novakova, 1890) (CLV2) fue empleada para realizar todos los ensayos de remoción de metales y plaguicidas (Cu, Pb, Cr, Atr y End) y de inhibición del crecimiento algal presentados en esta tesis.

Las microalgas se cultivaron durante 10 días en condiciones estériles en medio nutritivo propuesto por Sager y Granick (1953) (Bold Basal Medium (BBM): NaNO_3 , 250 mgL^{-1} ; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 25 mgL^{-1} ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 75 mgL^{-1} ; K_2HPO_4 , 75 mgL^{-1} ; KH_2PO_4 , 175 mgL^{-1} ; NaCl , 25 mgL^{-1} ; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 4.98 mgL^{-1} ; H_2SO_4 , 0.001 mgL^{-1} ; H_3BO_3 , 11.42 mgL^{-1} ; EDTA, 50 mgL^{-1} ; KOH , 31 mgL^{-1} ; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 8.82 mgL^{-1} ; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 14.4 mgL^{-1} ; MoO_3 , 0.71 mgL^{-1} ; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1.57 mgL^{-1} ; y $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.49 mgL^{-1} . El cultivo se mantuvo en condiciones controladas de temperatura (23 ± 1 °C), con aireación, agitación e iluminación uniforme y continua (100 r.p.m.; 3000 lux). El pH del medio fue de 6.25.

Las microalgas se cosecharon en fase de crecimiento exponencial, se centrifugaron 2 veces y se resuspendieron en agua bidestilada ultrapura estéril 24 h antes del inicio de cada ensayo de remoción. Su concentración fue estimada con cámara de Neubauer ($1.020.000$ cél. mL^{-1}) y espectrofotometría (Abs 1.5λ a 650 nm). Este concentrado algal fue empleado tanto en los ensayos de remoción como en los test de inhibición del crecimiento algal.

4.2.- Ensayos de remoción de metales pesados

4.2.1.- Eficiencia de remoción de metales pesados de soluciones enriquecidas con Cu y Pb

Los ensayos de remoción de Cu y Pb fueron llevados a cabo utilizando soluciones stock de calidad analítica, cuya concentración para ambos metales fue de 1000 mgL^{-1} : $(\text{NO}_3)_2 \text{Cu}$ (Merck 1.19786.0500- NO_3H 0.5 M/L) y $(\text{NO}_3)_2 \text{Pb}$ (Merck 1.19776.0500- NO_3H 0.5 M/L).

Se colocaron 50 mL del concentrado algal (según lo descrito en 4.1.) en cada recipiente y se agregaron tres concentraciones reales de Cu^{+2} ($\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$: 0.45 [C1], 1.30 [C2] y 1.65 [C3] mgL^{-1} , y tres de Pb^{+2} ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$: 1.951 [C1], 2.826 [C2] y 4.830 [C3] mgL^{-1} con sus respectivos controles por triplicado, para cada tiempo de exposición. Los ensayos se mantuvieron en cámara de incubación bajo condiciones controladas de temperatura (23 ± 1 °C), iluminación continua (3000 lux) y agitación diaria. A los 10 y 30 min, 1, 12 y 24 h de exposición se centrifugaron durante 10 min a 3500 r.p.m., separando el sobrenadante del pellet de algas. Ambas matrices (pellets y sobrenadante) fueron digeridas y analizadas por espectrofotometría de absorción atómica. Se registró el pH al comenzar y finalizar cada ensayo.

4.2.2.- Eficiencia de remoción de Cr de efluentes industriales

Los efluentes fueron aportados por el “Consortio para la Preservación de la Ecología S.A.-CPE”. Este consorcio se formó en el año 1994 en la ciudad de Esperanza (Santa Fe) para la construcción de una planta de tratamientos de efluentes industriales. Los usuarios actuales son: SADESA S.A., Copox S.R.L., Yeruvá S.A., también recibe los efluentes de Manufacturas del Interior S.A. y de la Municipalidad de la ciudad de Esperanza. Desde el año 2001, el CPE cuenta con la certificación de Normas ISO 14001. En la planta de tratamiento se emplean inicialmente procesos físicos, mediante los que se separan los componentes sólidos y semisólidos, y se acondiciona el efluente para pasar a la etapa posterior, en la cual se aplican procesos fisicoquímicos. Éstos tienen como finalidad disminuir la carga de contaminantes por oxidación de los sulfuros, precipitación y decantación del Cr^{+3} y de la materia orgánica. Por último, en la etapa microbiológica se emplean bacterias aeróbicas para eliminar los contaminantes residuales de la etapa anterior. El reactor biológico está compuesto por barros activados, conformado por un recipiente de 8750 m^3 , cada canal tiene una longitud de 53.7 m y 17.5 m de ancho. Dispone de 6 rotoaireadores, con sensores de oxígeno disuelto, controlando los niveles mínimos (2 mgL^{-1}) y máximos (4 mgL^{-1}) aceptables para permitir la eficiencia del proceso. Diariamente se realiza un examen microbiológico del barro mediante observación microscópica y conteo de bacterias filamentosas (Mayol y Hammerly, 2012). En la siguiente tabla se muestran las características fisicoquímicas del efluente a tratar mediante el mencionado proceso:

Parámetro	Promedio
pH	7.5-8.5
DQO (mgL^{-1})	4300-4500
DBO (mgL^{-1})	1200-1400
SS (Sol. Suspendidos) (mgL^{-1})	3300-3500
Sulfúrico (mgL^{-1})	100-150
Cr^{+3} (mgL^{-1})	10-20
SSET (mgL^{-1})	100-200

Tabla 12: Parámetros fisicoquímicos del efluente que ingresa a la planta de tratamiento del Consorcio para la preservación de la ecología S.A. Esperanza. Santa Fe (Mayol y Hammerly, 2012).

Finalmente, el efluente ya tratado es transportado hacia una cámara de cloración para eliminar la presencia de posibles gérmenes patógenos y luego es volcado hacia el curso receptor (río Salado). Según los datos aportados por el personal técnico, el tiempo de residencia aproximado que transcurre desde que el efluente entra al reactor biológico hasta que sale del mismo es de 36 h aproximadamente. La capacidad nominal de la planta es de 6.000 m^3 , con un coeficiente de seguridad del 25% (Figs. 45 y 46).



Figura Nº 45: Planta de tratamientos de efluentes. Consorcio para la preservación de la ecología S.A. Esperanza. Santa Fe.

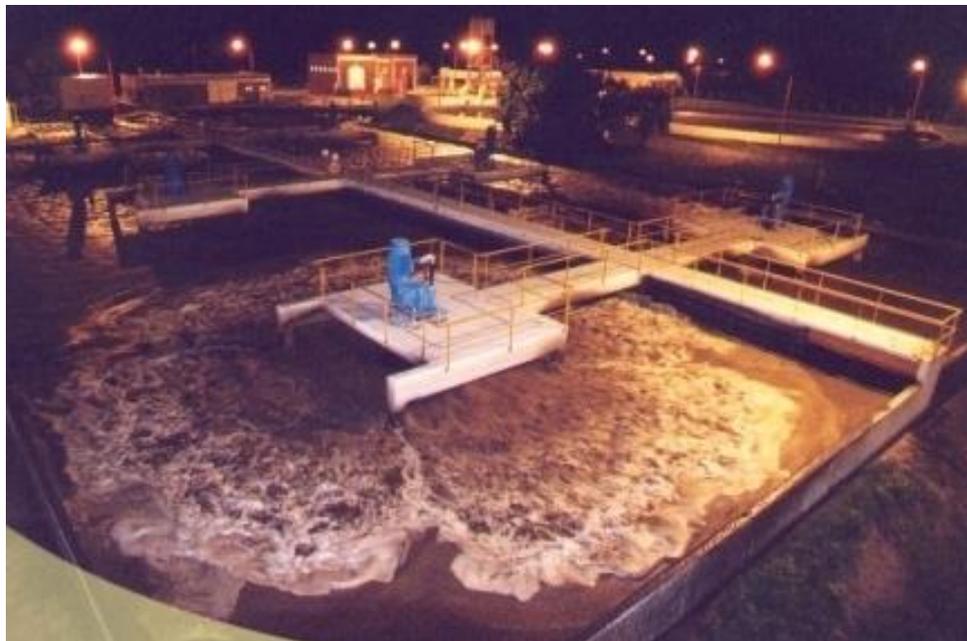


Figura Nº 46: Reactor Biológico de la planta de tratamientos de efluentes. Consorcio para la preservación de la ecología S.A. Esperanza. Santa Fe.

A continuación se detalla la procedencia de cada una de las diluciones empleadas en esta tesis y la metodología aplicada en los ensayos de remoción realizados a escala de laboratorio: Se tomaron 50 mL del concentrado algal anteriormente descrito y se centrifugaron nuevamente. Al pellet obtenido se le agregaron 50 mL de efluente con las siguientes concentraciones reales de Cr: 4.870 [D1], 3.158 [D2] y 0.424 [D3] mgL^{-1} con sus respectivos controles por triplicado, para cada tiempo de exposición.

La dilución 1 [D1] correspondió a la fracción de efluentes tratados en planta con procedimientos físicos y químicos, previo al tratamiento biológico (bacteriano); D2 se obtuvo por dilución de D1 al 50 %; D3 correspondió al efluente final cuyo destino es el río Salado. Los ensayos se mantuvieron en cámara de incubación bajo condiciones controladas de temperatura

($23 \pm 1^\circ\text{C}$), iluminación continua (3000 lux) y agitación diaria. A las 12, 24 y 48 h de exposición se centrifugaron durante 10 min a 3500 r.p.m., separando el efluente del pellet de algas. Ambas matrices fueron digeridas y analizadas por espectrofotometría de absorción atómica. Se registró el pH al comenzar y finalizar cada ensayo.

4.2.3.- Determinación de las concentraciones de Cu, Pb y Cr en el sobrenadante (soluciones acuosas) y en las microalgas (pellet) e instrumental empleado

Luego de centrifugadas, las microalgas (pellet) fueron digeridas por la tesisista siguiendo la metodología propuesta por EPA Method 200.3 (USEPA, 1991 a). En tanto que para determinar los iones de metales pesados remanentes en los sobrenadantes, éstos fueron digeridos según EPA Method 200.2 (USEPA, 1991 b). Las concentraciones de los metales fueron medidas con un espectrofotómetro de absorción atómica marca Perkin Elmer (modelo PE 8000) equipado con horno de grafito, usando técnicas estandarizadas para la calibración. Los límites de detección fueron >3 , >4 y $>5 \mu\text{gL}^{-1}$ para Cu, Pb y Cr, respectivamente. Se emplearon reactivos de calidad analítica certificados. Se realizaron blancos para todos los análisis. La calibración de los blancos fue controlada al comienzo y final de las determinaciones para cada grupo de muestras de cada metal para comprobar el posible nivel de variación en la calibración del instrumental.

4.3.- Ensayos de remoción de plaguicidas

4.3.1.- Eficiencia de remoción de Plaguicidas de soluciones enriquecidas con Atrazina (Atr) y Endosulfán (End)

Se empleó el insecticida con Endosulfán marca Zebra Ciagro™ (Ciagro, S.A. Buenos Aires, Argentina), conteniendo 35 % del organoclorado endosulfán (End) como ingrediente activo (6, 7, 8, 9, 10, 10-hexacloro-1, 5, 5a, 6, 9, 9a-hexahidro- 6, 9-metano-2, 4, 3, benzodioxantiopin-3-oxido). Mientras que la atrazina (90WG D, Equipagro de Monsanto) contenía 90 gr del componente activo [2,cloro-4-(etilamino)-6-(isopropilamino)s-triazina] y 100 gr de inertes (c.s.p). Al preparar las soluciones stock, se consideró la concentración del ingrediente activo presente en cada formulado. Estos productos fueron diluidos en agua bidestilada ultrapura estéril empleando recipientes separados de vidrio color ámbar, obteniéndose una concentración de 100mgL^{-1} para Atr y End.

Se colocaron 50 mL del concentrado algal (según 4.1.) en cada recipiente y se agregaron dos concentraciones reales de Atr: 43.9 [C1] y 131 [C2] μgL^{-1} , y tres de End: 7.4 [C1], 26 [C2] y 73 [C3] μgL^{-1} con sus respectivos controles por triplicado, para cada tiempo de exposición. Se mantuvieron en cámara de incubación bajo condiciones controladas de temperatura ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), iluminación continua (3000 lux) y agitación diaria. A las 24 h de exposición se centrifugaron durante 10 min a 3500 r.p.m., separando el pellet de algas del sobrenadante. En esta última

matriz se aplicaron las técnicas analíticas que nos permitieron conocer las concentraciones remanentes de Atr y End. Se registró el pH al comenzar y finalizar cada ensayo.

4.3.2.- Determinación de las concentraciones de plaguicidas en el sobrenadante

Se determinó Atr y End en el sobrenadante mediante cromatografía líquida de alta resolución (UHPLC) y cromatografía Gaseosa (GC-ECD) respectivamente. Los procedimientos analíticos se detallaron en la sección 4.1.3.2 del capítulo I.

4.4.- Efectos de metales pesados y plaguicidas sobre el crecimiento de *C. vulgaris*

4.4.1.- Inhibición del crecimiento algal con metales pesados

Se realizaron ensayos para evaluar el efecto inhibitorio de Cu^{+2} , Cr^{+6} y Pb^{+2} sobre el crecimiento poblacional de *C. vulgaris* siguiendo procedimientos estandarizados (OECD, 1984). Tres horas antes del inicio del ensayo y en fase de crecimiento exponencial, las algas se centrifugaron y resuspendieron dos veces en medio nutritivo (Bold Basal Medium (BBM) estéril. A continuación se determinó la densidad celular con microscopio óptico y cámara de Neubauer. Una vez conocido el número de células del cultivo stock, se calculó el volumen a inocular, para obtener en cada ensayo una concentración inicial de $10.000 \text{ cél.mL}^{-1}$. Se emplearon erlenmeyers (250 mL) con 100 mL de medio de cultivo BBM estéril, enriquecido con 6 concentraciones de Cr^{+6} ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$): 0.05 [C1], 0.10 [C2], 0.20 [C3], 0.40 [C4], 0.80 [C5] y 1.60 [C6] mgL^{-1} ; Cu^{+2} (NO_3)₂ Cu: 0.025 [C1], 0.05 [C2], 0.10 [C3], 0.20 [C4], 0.40 [C5] y 0.80 [C6] mgL^{-1} ; Pb^{+2} ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$): 0.25 [C1], 0.50 [C2], 1 [C3], 2 [C4], 4 [C5] y 8 [C6] mgL^{-1} y el control (sin metales), con 3 réplicas por tratamiento. Los recipientes fueron colocados en cámara de incubación durante 72 h, homogeneizados diariamente y mantenidos a temperatura e iluminación constantes (25°C, 3.000 lux, respectivamente). A las 24, 48 y 72 h se tomaron 3 réplicas de 100 μl para cada conteo celular (cél.mL^{-1}). Se calculó la Concentración Efectiva 50 (CE_{50}) (24, 48 y 72 h) contando 25 cuadrantes de la cámara (error de estimación <10%, Venrick, 1978) y empleando el programa Probalg. La tasa de crecimiento (μ) fue calculada siguiendo a Guillard, (1975): ($\mu = \text{Log}_2(N_1/N_0)/t_1 - t_0$ donde N_1 = densidad celular final (cél.mL^{-1}), N_0 = densidad celular inicial (cél.mL^{-1}), t_1 = tiempo final, y t_0 = tiempo inicial). Se controló pH al iniciar y finalizar cada ensayo.

4.4.2.- Inhibición del crecimiento algal con plaguicidas

Se realizaron ensayos para evaluar comparativamente el efecto del glifosato (Gly), el endosulfán (End) y la atrazina (Atr) sobre el crecimiento poblacional de *C. vulgaris*. Se emplearon seis concentraciones: 0.5 [C1], 1 [C2], 2 [C3], 4 [C4], 8 [C5] y 16 [C6] mgL^{-1} de Gly; 0.25 [C1], 0.5 [C2], 1 [C3], 2 [C4], 4 [C5] y 8 [C6] mgL^{-1} de End y 0.01 [C1], 0.02 [C2], 0.04 [C3], 0.08 [C4], 0.16 [C5] y 0.32 [C6] mgL^{-1} de Atr con sus respectivos controles por triplicado. Los

ensayos y análisis se realizaron siguiendo la metodología propuesta en el punto anterior (4.4.1).

El formulado comercial de glifosato ESKOBA® (Ciagro S.A. Argentina) empleado en esta tesis presentó la siguiente composición: 48 % (w/v) de ingrediente activo (N-phosphonomethyl glycine salt) y 52 % de ingredientes inertes y coadyuvantes de grado analítico. La solución stock fue preparada diluyendo el formulado comercial en agua bidestilada estéril, obteniendo una concentración de 1000 mg (equivalente ácido) L⁻¹. Ésta fue conservada en la oscuridad a -4 °C hasta su determinación analítica, que fue realizada por cromatografía (Dionex DX-100) en el INTEC I (Parque Tecnológico Litoral Centro, Santa Fe). La concentración real de la solución stock de glifosato empleada para preparar las soluciones a ensayar en los test de inhibición del crecimiento algal fue 1067.5 (± 38.48) mgL⁻¹.

4.5.- Análisis numérico y estadístico de datos

Siguiendo a Perez-Rama y col. (2002), para cada tiempo de exposición y concentración se calculó el porcentaje de remoción (%) = (concentración de metal removido -adsorbido y absorbido-: metal registrado en el pellet de algas) / (concentración inicial de metal: metal en pellet + metal en sobrenadante) × 100; se realizaron correlaciones de Pearson para relacionar las concentraciones de Cu, Pb y Cr acumuladas por *C. vulgaris* y las remanente en el sobrenadante. Posibles diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el pH inicial y el registrado al finalizar cada ensayo fueron testeadas con el test de Wilcoxon.

A su vez, se analizaron posibles diferencias entre los porcentajes removidos de metales y plaguicidas en las concentraciones empleadas, utilizando ANOVA-MR con post test de Bonferroni (Sokal y Rohlf, 1969). La normalidad de los datos fue confirmada antes de cada prueba (test de Kolmogorov-Smirnov). Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete GraphPad INSTAT (InfoStat, 2004). Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0.05$.

Para comparar posibles diferencias significativas en las tasas de crecimiento de *C. vulgaris* entre controles y tratamientos con metales (Cu, Cr y Pb) y plaguicidas (Atr y End), se empleó análisis de la varianza con medias repetidas (ANOVA-MR), y post test de Dunnett. La misma prueba se utilizó para evaluar posibles diferencias entre las concentraciones iniciales de metales pesados y plaguicidas registradas en el sobrenadante y las obtenidas al finalizar el ensayo, transcurridos los distintos tiempos de exposición.

5.- RESULTADOS

5.1.- Ensayos de remoción de metales pesados

5.1.1.- Eficiencia de remoción de metales pesados de soluciones enriquecidas con Cu y Pb

Chlorella vulgaris mostró máxima eficiencia en C1, removiendo 81.97 % de Cu a los 10 min de exposición, a las 12 y 24 h 92.53 % y 95.07 % respectivamente. En C2 y C3 los porcentajes más altos se obtuvieron más tardíamente: a las 24 h acumuló 73.94 % y 41.43 % respectivamente (Fig. 47). Se registraron correlaciones significativas negativas entre la concentración final en las algas y en el sobrenadante: $r = -0.639$ - $p = 0.0104$ - $r^2 = 0.408$; $r = -0.993$ - $p < 0.0001$ - $r^2 = 0.986$ y $r = 0.722$, $p < 0.0023$, $r^2 = 0.522$ para C1, C2 y C3 respectivamente. No se observaron diferencias significativas ($p = 0.578$) entre los promedios de pH obtenidos al iniciar y finalizar cada ensayo ($6.20 (\pm 0.05)$ y $6.04 (\pm 0.3)$).

En los ensayos con Pb, las microalgas removieron 50% y 47% a los 10 min de exposición; 100% y 87% a la h de exposición en C1 y C2 respectivamente. El máximo porcentaje (72 %) fue obtenido a las 12 y 24 h en C3 (Fig. 47). Se registraron correlaciones significativas negativas entre la concentración final de Pb en las algas y en el sobrenadante: $r = -0.849$, $p < 0.0001$; $r = -0.880$, $p < 0.0001$; $r = -0.880$, $p < 0.0001$ en C1, C2 y C3 respectivamente. No se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los promedios de pH obtenidos al iniciar y finalizar cada ensayo ($6.17 (\pm 0.1)$ y $6.94 (\pm 1.3)$).

La Tabla 13 muestra las concentraciones de Cu y Pb (mgL^{-1}) registradas en el sobrenadante luego de 10 min, 30 min, 1 h, 12 h, y 24 h de exposición. En los tratamientos donde se ensayaron las dos concentraciones inferiores de Cu (C1 y C2), se registraron diferencias altamente significativas entre las concentraciones iniciales de Cu (0 min) y las remanentes en el sobrenadante obtenida luego de que las microalgas estuvieran expuestas al metal en todos los tiempos ensayados (ANOVA MR, $p < 0.01$). En C3, se encontraron diferencia altamente significativas (ANOVA MR, $p < 0.01$) después de los 30 minutos de exposición entre las concentraciones de Cu finales y al inicio del experimento (0 min), así como para todos los otros tiempos testeados. A su vez, se observaron diferencias altamente significativas en la concentración de Pb registrada al inicio del ensayo (0 min) con la obtenida en el sobrenadante en todos los tratamientos y tiempos ensayados (ANOVA MR, $p < 0.01$).

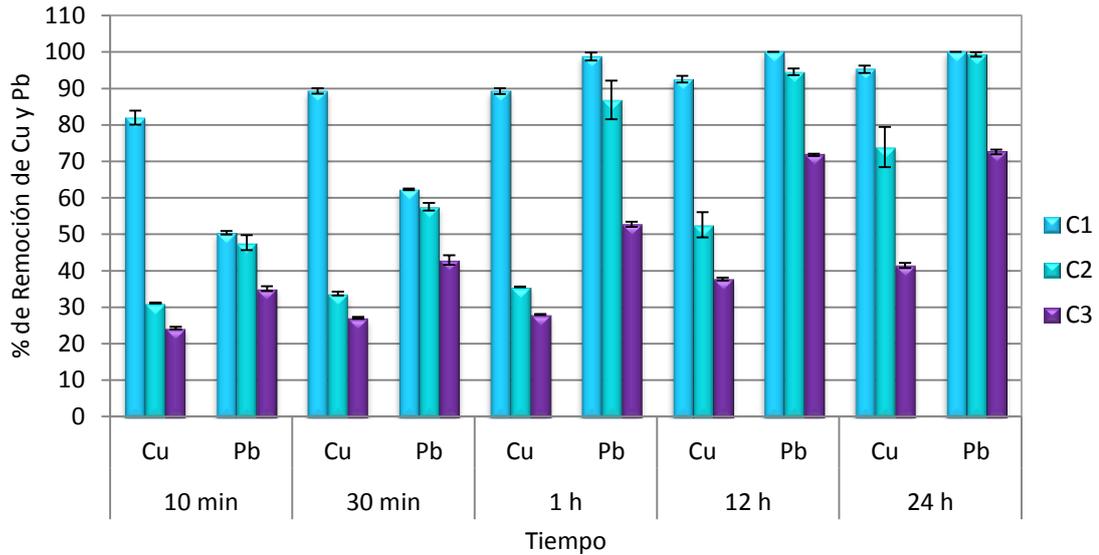


Figura N° 47: Cu y Pb (%) removido por *C. vulgaris* a los 10 min, 30 min, 1 h, 12 h y 24 h de exposición a tres concentraciones reales de Cu: 0.45 [C1], 1.30 [C2] y 1.65 [C3] mgL⁻¹ y Pb: 1.951 [C1], 2.826 [C2] y 4.83 [C3] mgL⁻¹. Tres réplicas por tratamiento. Las barras de error indican el desvío estándar.

Cobre						
Tiempo	0 min	10 min	30 min	1 h	12 h	24 h
Control	0.000 (± 0.00)	0.004 (± 0.01)	0.019 (± 0.022)	0.002 (± 0.001)	0.009 (± 0.01)	0.009 (± 0.006)
C1 (0.45 mg L ⁻¹)	0.45 (± 0.013)	0.088 (± 0.023)**	0.050 (± 0.006)**	0.056 (± 0.01)**	0.044 (± 0.012)**	0.026 (± 0.011)**
C2 (1.30 mg L ⁻¹)	1.3 (± 0.020)	1.015 (± 0.024)**	0.971 (± 0.055)**	0.958 (± 0.008)**	0.677 (± 0.039)**	0.367 (± 0.163)**
C3 (1.65 mg L ⁻¹)	1.65 (± 0.019)	1.546 (± 0.015)	1.378 (± 0.044)**	1.413 (± 0.028)**	1.289 (± 0.083)**	1.072 (± 0.062)**
Plomo						
Tiempo	0 min	10 min	30 min	1 h	12 h	24 h
Control	0.000 (± 0.00)	0.000 (± 0.001)	0.007 (± 0.012)	0.003 (± 0.006)	0.000 (± 0.00)	0.000 (± 0.00)
C1 (1.951 mgL ⁻¹)	1.951 (± 0.022)	1.377 (± 0.007)**	1.126 (± 0.032)**	0.026 (± 0.044)**	0.000 (± 0.00)**	0.000 (± 0.00)**
C2 (2.862 mgL ⁻¹)	2.862 (± 0.011)	1.682 (± 0.264)**	1.496 (± 0.096)**	0.341 (± 0.308)**	0.151 (± 0.052)**	0.018 (± 0.032)**
C3 (4.83 mgL ⁻¹)	4.83 (± 0.013)	2.784 (± 0.096)**	2.754 (± 0.183)**	2.075 (± 0.123)**	1.283 (± 0.051)**	1.134 (± 0.06)**

Tabla 13: Concentraciones de Cu y Pb (mgL⁻¹) en el sobrenadante luego de ser expuesta *C. vulgaris* durante 10 min, 30 min, 1 h, 12 h, y 24 h. (±) Desvío estándar (tres réplicas por tratamiento). Los asteriscos señalan diferencias significativas entre la concentración inicial y la registrada en los demás tiempos de exposición, testeados con ANOVA, MR y post test de Dunnett. (*) Diferencias significativas ($p < 0.05$); (**) Diferencias altamente significativas ($p < 0.01$).

5.1.2.- Eficiencia de remoción de cromo de efluentes industriales

En los ensayos de remoción de Cr realizados utilizando el efluente industrial previamente caracterizado, *C. vulgaris* mostró máxima eficiencia en D1 y D2, removiendo 88.56 (12 h), 92.12 (24 h) y 93.81 (48 h) %, y 95.08 (12 h), 96.61 (24 h) y 98.80 (48 h) % de Cr respectivamente. Contrariamente, los porcentajes más altos de remoción en D3 se obtuvieron a las 48 h, acumulando 52.71 % de Cr (Fig. 48). En D1 y D2 se registraron correlaciones negativas entre la concentración final de Cr en las algas y en el efluente: $r = -0.2090 - p = 0.5895$ y $r = -0.7191 - p = 0.0290$, respectivamente. En D3 hubo correlación positiva y no significativa ($r = 0.5876$ y $p = 0.0962$). No se observaron diferencias significativas cuando se comparó el Cr remanente en los efluentes entre los diferentes tiempos de exposición ($p = 0.117$). Se obtuvieron los siguientes valores promedios de pH al iniciar y finalizar los ensayos: 6,84 ($\pm 0,87$) y 7,06 ($\pm 1,3$) ($p = 0,09$).

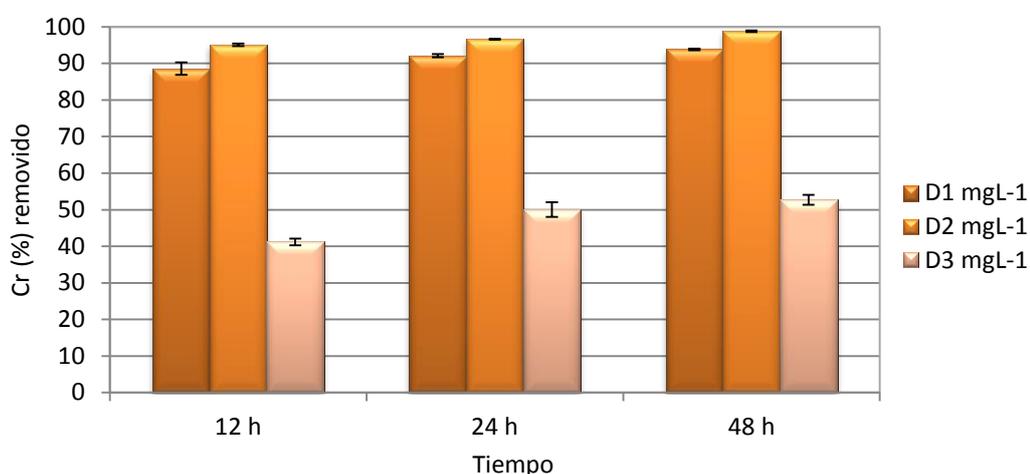


Figura N° 48: Cr (%) removido por *C. vulgaris* a las 12 h, 24 h y 48 h de exposición a tres diluciones de efluentes. Cr: 4.870 [D1], 3.158 [D2] y 0.424 [D3] mgL⁻¹. Promedios de tres réplicas por tratamiento. Las barras de error indican el desvío estándar.

En la figura 49 se esquematiza el recorrido del efluente (flechas rojas), las concentraciones iniciales de Cr (mgL⁻¹) (círculos verdes), y las obtenidas luego de exponer a *C. vulgaris* a cada una de las diluciones ensayadas (D1, D2 y D3) durante 12 h, 24 h y 48 h. Como puede observarse, se obtuvieron diferencias altamente significativas entre las concentraciones de Cr registradas al inicio del ensayo en todas las diluciones testeadas, con respecto a las observadas luego de exponer a las microalgas durante los tiempos ensayados (ANOVA MR, $p < 0.01$).

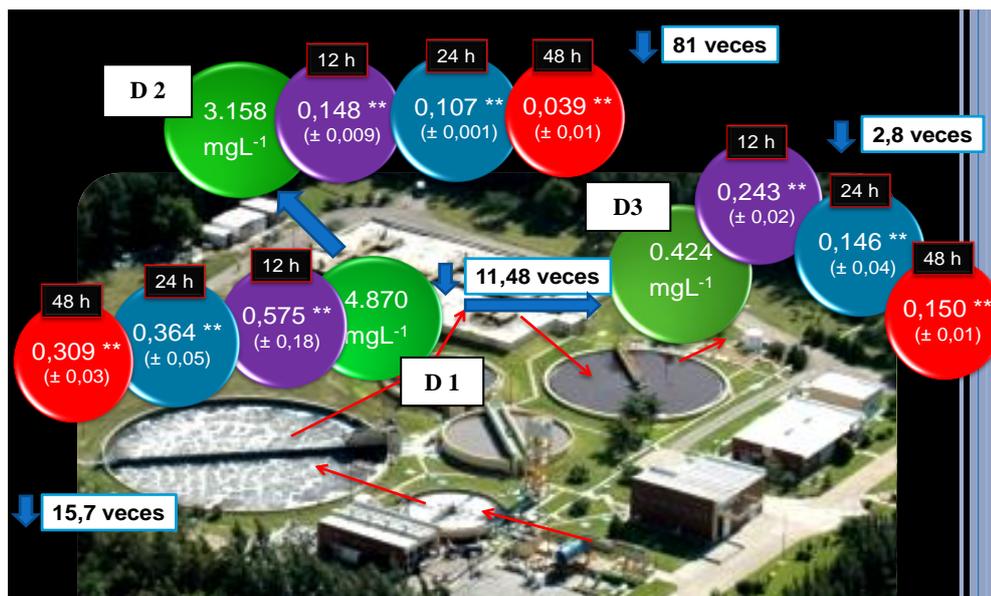


Figura N° 49: Concentraciones iniciales de Cr (mgL⁻¹) en D1, D2 y D3 (Círculos verdes), y en el sobrenadante luego de la exposición a la acción de *C. vulgaris* durante 12 h (Círculos lilas), 24 h (Círculos celestes) y 48 h (Círculos rojos). Las flechas rojas indican el recorrido del efluente. (±) Desvío estándar (tres réplicas por tratamiento). Los asteriscos señalan diferencias significativas entre la concentración inicial y la registrada en los demás tiempos de exposición, testeados con ANOVA, MR y post test de Dunnett. (*) Diferencias significativas ($p < 0.05$); (**) Diferencias altamente significativas ($p < 0.01$).

5.2.- Ensayos de remoción de plaguicidas

5.2.1.- Eficiencia de remoción de Plaguicidas de soluciones enriquecidas con Atr y End

Chlorella vulgaris mostró mayor eficiencia para remover End que Atr. No se encontraron diferencias significativas entre los porcentajes removidos de End en C1, C2 y C3 (ANOVA-MR, $p = 0.7301$), acumulando 95.34 %, 94.93 % y 95.93 %, respectivamente (Fig. 50). A su vez, se encontraron diferencias extremadamente significativas entre las concentraciones iniciales y finales, luego de las 24 h de exposición (ANOVA-MR, $p < 0.0001$) (Tabla 14). Se obtuvieron los siguientes valores promedios de pH al iniciar y finalizar los ensayos: 4.82 (±0.11) y 5.58 (±0.25) ($p > 0.05$).

Porcentajes de remoción inferiores se obtuvieron al exponer a las microalgas a Atr (11,16 % y 51.39 % en C1 y C2, respectivamente) (Fig. 50) aunque se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones iniciales y finales y los % acumulados en dichas concentraciones (ANOVA-MR $p < 0.05$). No se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los promedios de pH obtenidos al iniciar y finalizar cada ensayo: 4.87 (± 0.06) y 5.52 (± 0.21).

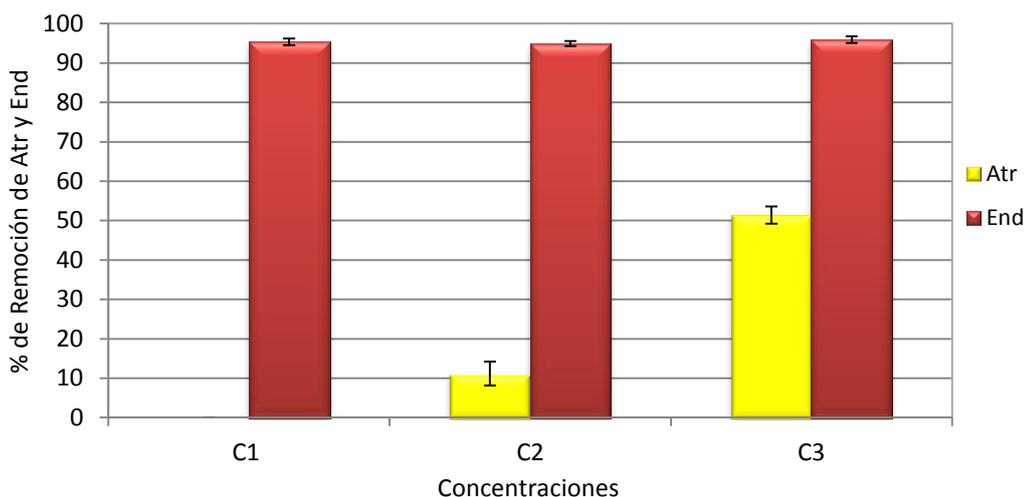


Figura N° 50: Atr y End (%) removido por *C. vulgaris* a las 24 h de exposición a dos concentraciones reales de Atr: 43.9 [C1] y 131 [C2] μgL^{-1} , y tres de End: 7.4 [C1], 26 [C2] y 73 [C3] μgL^{-1} . Promedios de tres réplicas por tratamiento. Las barras de error indican el desvío estándar.

Concentración	Atrazina		Endosulfán	
	T. inicial (0 h)	T. Final (24 h)	T. Inicial (0 h)	T. Final (24 h)
C1 (μgL^{-1})	-	-	7,4 (± 0)	0,171 ($\pm 0,06$)***
C2 (μgL^{-1})	43,9 (± 0)	39 ($\pm 2,6$) *	26 (± 0)	0,658 ($\pm 0,17$)***
C3 (μgL^{-1})	131 (± 0)	63,66 ($\pm 5,7$) **	73 (± 0)	1,416 ($\pm 0,62$)***

Tabla 14: Concentraciones de Atr y End (μgL^{-1}) en el sobrenadante luego de la exposición a la acción de *C. vulgaris* durante 24 h. (\pm) Desvío estándar (tres réplicas por tratamiento). Los asteriscos denotan diferencias significativas entre las concentraciones iniciales y finales de Atr y End, testeado con test t pareado. (*) Diferencias significativas ($p < 0.05$); (**) Diferencias altamente significativas ($p < 0.01$); (***) Diferencias extremadamente significativas ($p < 0.001$).

5.3.- Efectos de metales pesados y plaguicidas sobre el crecimiento de *C. vulgaris*

5.3.1.- Concentraciones Efectivas 50

Los valores de CE_{50} obtenidos en los diferentes tiempos de exposición (24, 48 y 72 h) para metales pesados y plaguicidas se muestran en la Tabla 15. En el caso del Cr y del End las concentraciones efectivas disminuyeron con el incremento en el tiempo de exposición. Mientras que el Pb y el Gly mostraron un efecto estimulador, con un aumento de la CE_{50} a medida que transcurría el período de exposición. La Atr y el Cu mostraron un comportamiento variable, con incremento de la CE_{50} a las 48 h, disminuyendo luego. La sensibilidad de *C. vulgaris* varió entre los diferentes contaminantes testeados mostrando el siguiente orden de toxicidad a las 72 h: Cu > Cr > Pb y Atr > End > Gly.

METALES PESADOS	COBRE	CROMO	PLOMO
CE ₅₀ 24 h (mgL ⁻¹)	0.9405	4.0111	0.1697
CE ₅₀ 48 h (mgL ⁻¹)	1.0069	3.4451	0.4997
CE ₅₀ 72 h (mgL ⁻¹)	0.4530	0.8725	1.8515
PLAGUICIDAS	GLIFOSATO	ENDOSULFÁN	ATRAZINA
CE ₅₀ 24 h (mgL ⁻¹)	4	40.588	0.319
CE ₅₀ 48 h (mgL ⁻¹)	9.128	23.675	2.645
CE ₅₀ 72 h (mgL ⁻¹)	58.599	1.487	1.057

Tabla 15: Concentraciones efectivas para el 50 % de la población de *C. vulgaris* (CE₅₀, mgL⁻¹) obtenida a las 24, 48 y 72 h de exposición a metales pesados (Cu, Cr y Pb) y plaguicidas (Gly, End y Atr). Seis concentraciones y el control. Tres réplicas por tratamiento.

5.3.2.- Efectos de metales pesados (Cu, Cr y Pb) sobre la tasa de crecimiento de *C. vulgaris*

La tasa de crecimiento (μ) de *C. vulgaris* se vió afectada en los tratamientos con Cr tanto a las 48 h como a las 72 h, disminuyendo significativamente con respecto al control cuando fueron expuestas a: C2 (ANOVA-MR, $p < 0.05$), C4 (ANOVA-MR, $p < 0.05$), C5 (ANOVA-MR, $p < 0.01$) y C6 (ANOVA-MR, $p < 0.01$), resultados similares se obtuvieron a las 48 h cuando las microalgas se expusieron al Cu. A las 72 h μ mostró ser significativamente diferente en las concentraciones mayores de Cr (C4, C5 y C6) (ANOVA-MR, $p < 0.05$) así como en todos los tratamientos con Cu con respecto al control (ANOVA-MR, $p < 0.01$). La tasa de crecimiento en los ensayos con la mayor concentración de Pb mostró un efecto estimulador con respecto al control (ANOVA-MR, 24 y 48 h: $p < 0.01$; y 72 h: $p < 0.05$). También se encontraron diferencias extremadamente significativas cuando se comparó μ en los diferentes tiempos de exposición para los tres metales estudiados (ANOVA-MR, $p < 0.0001$) (Fig. 51).

Los valores promedios de pH registrados al comenzar y al finalizar los ensayos con Pb y Cr no mostraron variaciones significativas ($p = 0.57$) (Pb: 6.17 (± 0.1) - 6.94 (± 1.3) y Cr: 6.262 (± 0.06) - 6.267 (± 0.08)).

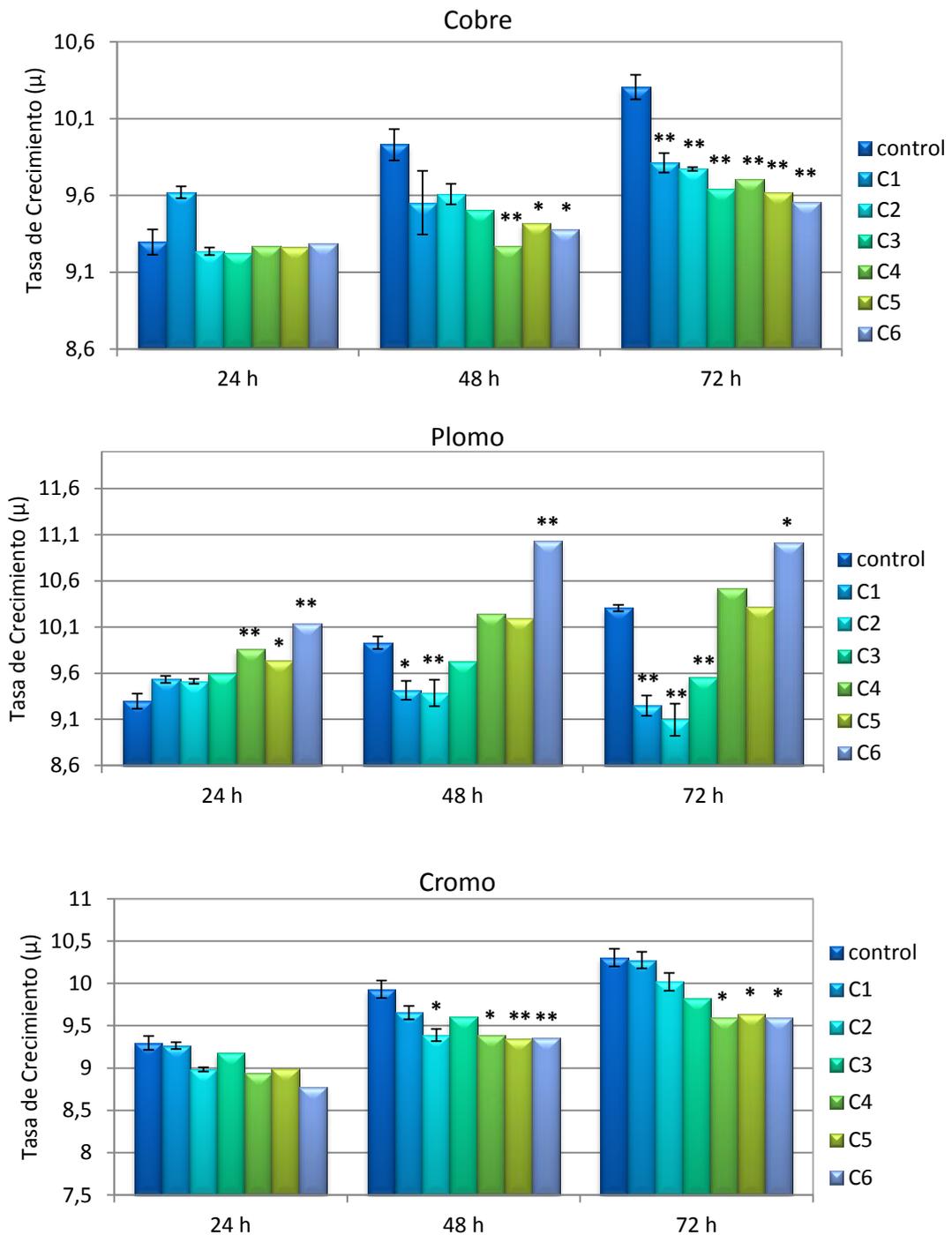


Figura N° 51: Tasa de Crecimiento (μ) de *C. vulgaris* expuesta a seis concentraciones de Cu: 0.02 [C1], 0.05 [C2], 0.10 [C3], 0.20 [C4], 0.40 [C5], 0.80 [C6] mgL^{-1} ; Pb: 0.25 [C1], 0.50 [C2], 1.0 [C3], 2.0 [C4], 4.0 [C5], 8.0 [C6] mgL^{-1} ; Cr: 0.05 [C1], 0.10 [C2], 0.20 [C3], 0.40 [C4], 0.80 [C5] y 1.60 [C6] mgL^{-1} , y el control (sin metales) por 24 h, 48 h y 72 h. (\pm) Desvío estándar (tres réplicas por tratamiento). Los asteriscos denotan diferencias significativas entre controles y tratamientos, testeado con ANOVA-MR y post test de Dunnett. (*) Diferencias significativas ($p < 0.05$); (**) Diferencias altamente significativas ($p < 0.01$).

5.3.3.- Efectos de Plaguicidas (Gly, End y Atr) sobre la tasa de crecimiento de *C. vulgaris*

El incremento de la concentración del herbicida glifosato y el tiempo de exposición redujeron la tasa de crecimiento de *C. vulgaris*. Luego de 24 h, se observó una leve estimulación de la división celular en la concentración más alta (ANOVA MR, $p < 0.05$). Después de las 48 h, en C6 se observaron efectos negativos sobre la tasa de crecimiento (ANOVA MR, $p < 0.01$), y a las 72 h ésta fue inhibida de manera significativa en las cinco concentraciones más altas (C2-C6; ANOVA MR, $p < 0.01$) (Fig. 52).

También el endosulfán y la atrazina afectaron la tasa de crecimiento de *C. vulgaris*. A medida que se incrementaban las concentraciones y el tiempo de exposición los efectos negativos sobre la división celular fueron más evidentes. Se encontraron diferencias significativas con respecto al control en las concentraciones mayores de End (C5 y C6) y de Atr (C6) a las 48 h, mientras que a las 72 h todas las concentraciones de End ensayadas mostraron ejercer efectos negativos significativos sobre la tasa de crecimiento (ANOVA MR, $p < 0.01$) (Fig. 52). Se registraron además diferencias extremadamente significativas cuando se comparó μ en los diferentes tiempos de exposición ($p < 0.0001$) para los tres plaguicidas estudiados.

Los valores promedios de pH registrados al comenzar y al finalizar los ensayos de inhibición del crecimiento con Atr (6.23 (± 0.07) - 6.31 (± 0.1)) y End (6.19 (± 0.03) - 6.33 (± 0.05)), mostraron ser diferentes significativamente ($p = 0.01$ y $p = 0.03$, respectivamente). Mientras que los valores promedios de pH registrados en los ensayos con Gly no mostraron variaciones significativas: 6.15 (± 0.13) - 6.18 (± 1.1) ($p = 0.31$).

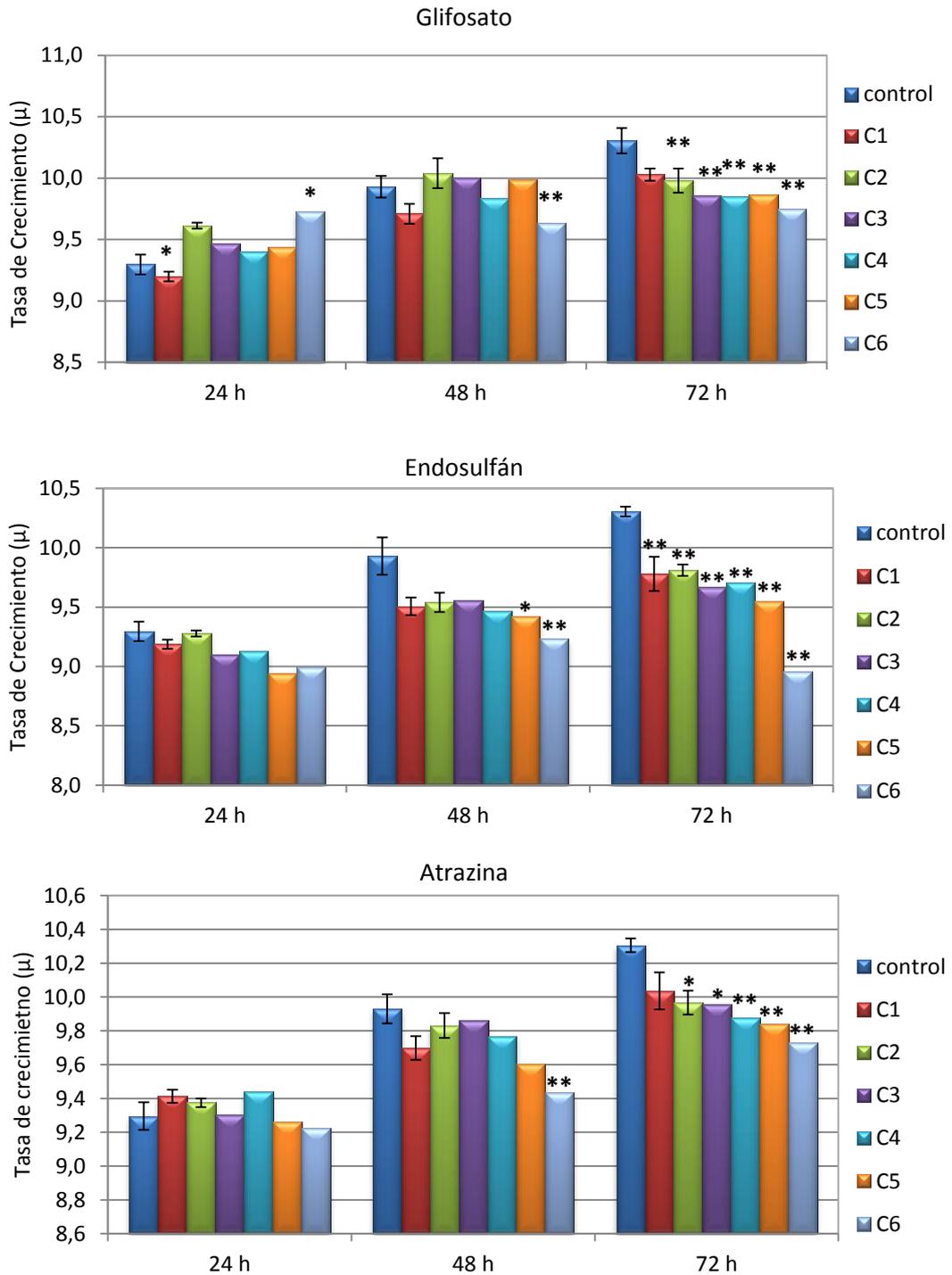


Figura N° 52: Tasa de Crecimiento (μ) de *C. vulgaris* expuesta a seis concentraciones de Gly: 0.5 [C1], 1 [C2], 2 [C3], 4 [C4], 8 [C5] y 16 [C6] mgL^{-1} ; 0.25 [C1], 0.5 [C2], 1 [C3], 2 [C4], 4 [C5] y 8 [C6] mgL^{-1} de End; 0.01 [C1], 0.02 [C2], 0.04 [C3], 0.08 [C4], 0.16 [C5] y 0.32 [C6] mgL^{-1} de Atr, y el control (sin plaguicidas) por 24 h, 48 h y 72 h. (\pm) Desvío estándar (tres réplicas por tratamiento). Los asteriscos denotan diferencias significativas entre controles y tratamientos, testeado con ANOVA-MR y post test de Dunnett. (*) Diferencias significativas ($p < 0.05$); (**) Diferencias altamente significativas ($p < 0.01$).

6.- DISCUSIÓN PARCIAL

Considerando la problemática planteada en los capítulos anteriores referentes a la contaminación acuática con metales pesados y plaguicidas, surge la necesidad de avanzar en la investigación de técnicas de remediación empleando como modelo biológico a *Chlorella vulgaris*. A continuación se discuten los resultados obtenidos a escala de laboratorio referentes a la eficiencia de remoción de metales y plaguicidas que presentan las microalgas y sus efectos sobre el crecimiento.

6.1.- Ensayos con Cu. Test de inhibición del crecimiento y eficiencia de remoción de *C. vulgaris*.

Los resultados obtenidos demostraron que el Cu fue el metal más tóxico seguido por el Cr y el Pb. Los valores de CE_{50} obtenidos en los ensayos con Cu fueron 0.94, 1.00 y 0.45 mgL^{-1} a las 24, 48, y 72 h, respectivamente (Tabla 15). A su vez, se observó que la tasa de crecimiento (μ) de *C. vulgaris* disminuía con el incremento en el tiempo de exposición y en la concentración de Cu. Ésta fue significativamente menor y diferente a la del control en C4, C5, y C6 luego de las 48 h de exposición (ANOVA-MR, $p < 0,01$). Después de las 72 h, también hubo diferencias significativas entre el control y todas las concentraciones ensayadas (ANOVA-MR, $p < 0,01$) (Fig. 51). Los valores promedios de pH registrados al comenzar y al finalizar los ensayos no mostraron diferencias significativas ($p = 0.57$), éstos variaron entre 6.20 (± 0.05) y 6.04 (± 0.3). Yan y Pan (2002) expusieron a las microalgas *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella pyrenoidosa* y *Closterium lunula* a concentraciones similares de Cu, aunque a pH superiores a los ensayados en este trabajo (pH = 7), y obtuvieron concentraciones efectivas inferiores a las aquí registradas: CE_{50} : 50, 68 y 200 μgL^{-1} para las tres especies, respectivamente. Según Wilde y col. (2006), la toxicidad del Cu para especies del genero *Chlorella* depende directamente del pH, donde un incremento del mismo refleja un aumento en la toxicidad, con efectos directos en la eficiencia fotosintética, inhibiendo el transporte de electrones del fotosistema II (Baron y col., 1995), disminuyendo la transcripción del gen rbc (codificante la subunidad Rubisco), la asimilación de CO_2 y afectando actividades enzimáticas (Qian y col., 2009).

Pese a los efectos del Cu sobre el crecimiento de *C. vulgaris*, las microalgas resultaron ser muy eficiente en los ensayos de remoción de este metal (Fig. 47). Cuando se expuso a la menor concentración (C1: 0.45 mgL^{-1}), acumuló 81.97 %, 92.53 % y 95.28 % luego de 10 min, 12 h y 24 h de exposición, respectivamente. A las 24 h removi6 73.94 % y 41.44 % en C2 (1.30) y C3 (1.65 mgL^{-1}).

Aunque no todo el Cu fue removido de las soluciones enriquecidas con dicho metal, en C1 y C2 se registraron diferencias altamente significativas (ANOVA-MR, $p < 0.01$) luego de los 10 minutos de exposición, cuando se compar6 con la concentración registrada al inicio del

experimento (0 min) y en todos los tiempos testeados. En C3, encontramos diferencia altamente significativa después de los 30 minutos de exposición en comparación con la concentración de Cu registrada al inicio del ensayo (0 min), también para todos los tiempos de exposición (Tabla 13). Se obtuvieron correlaciones negativas significativas entre la concentración final de Cu registrado en las algas y en el sobrenadante.

Los resultados demostraron que las microalgas removieron altos porcentajes de Cu en períodos de tiempo cortos (10 min). Contrariamente, Yan y Pan (2002) reportaron 6 días de exposición para obtener una eficiencia de remoción de 95%, 79% y 67% (concentración inicial de 0.05 mgL^{-1}) utilizando a *C. pyrenoidosa*, *C. lunula* y *S. obliquus*, respectivamente. Es ampliamente conocido que el pH condiciona la adsorción de iones metálicos a causa de sus efectos sobre la solubilidad del metal y el grado de disociación de los grupos funcionales localizados en las superficies adsorbentes. De acuerdo con Vannela y Verma (2006), la tasa de adsorción del metal disminuye considerablemente con un aumento en la alcalinidad ($\text{pH} > 6.0$ - 7.0) debido a que los iones metálicos precipitan como hidróxidos. A su vez, cuando el pH es < 3.0 , los iones de hidrógeno compiten con los iones de metal por los mismos sitios de adsorción presentes en el bioadsorbente. En los ensayos de remoción con Cu, los valores promedios de pH ($4.89 (\pm 0.65)$ y $4.24 (\pm 1.07)$) se encontraron dentro del rango propuesto por dichos autores para la obtención de una máxima eficiencia de remoción ($3.0 < \text{pH} < 7.0$).

6.2.- Ensayos con Pb. Test de inhibición del crecimiento y eficiencia de remoción de *C. vulgaris*

De manera contraria a los resultados obtenidos con Cu, los valores de CE_{50} obtenidos en los ensayos con Pb mostraron incrementarse a medida que transcurría el tiempo de exposición. Éstos fueron 0.16 , 0.49 y 1.85 mgL^{-1} a las 24, 48 y 72 h, respectivamente (Tabla 15). Se observaron además variaciones en la tasa de crecimiento de *C. vulgaris* al ser expuesta a Pb durante 48 y 72 h, registrándose efectos negativos significativos en las concentraciones inferiores testeadas (0.25 a 1 mgL^{-1}) (ANOVA-MR, $p < 0.01$). De acuerdo con Nacorda y col. (2007) y Sacan y col. (2007), la toxicidad de este metal puede ser atribuida a su interacción directa con las membranas de los tilacoides presentes en los cloroplastos. Estas estructuras son consideradas las más sensibles ante la exposición a metales pesados en las células de *C. vulgaris*. Contrariamente, concentraciones superiores de Pb estimularon la división celular, mostrando un incremento en la tasa de crecimiento significativamente diferente cuando se comparó la concentración más alta testada (8 mgL^{-1}) con la obtenida en control (Fig. 51). Este patrón de estimulación puede ser similar a las respuestas horméticas encontradas por otros investigadores en estudios ecotoxicológicos (Calabrese y col., 1999; Sacan y col., 2007; Sáenz y Di Marzio, 2009; Spoljaric y col., 2011), quienes observaron comportamientos compensatorios relacionados con la asignación de recursos energéticos para garantizar la homeostasis ante la

exposición a condiciones adversas (Sáenz y col., 2012). Sin embargo, es necesario profundizar en torno a tales respuestas.

La eficiencia de remoción de Pb por *C. vulgaris* mostró ser similar en las concentraciones inferiores testeadas (C1: 1.951 mgL⁻¹ y C2: 2.826 mgL⁻¹) (ANOVA-MR, $p > 0,05$), aunque significativamente inferior en C3 (4.83 mgL⁻¹) (ANOVA-MR, $p < 0,001$). *C. vulgaris* removió 50.43% y 47.69% de Pb después de los 10 minutos de exposición, en tanto que transcurrida una hora la eficiencia se incrementó en un 98.74% y 86.89% en C1 y C2, respectivamente. A las 12 h de exposición, el 100% del metal fue acumulado por las microalgas en la concentración menor ensayada. Porcentajes máximos de remoción se obtuvieron en C2 a las 12 h (94.56%) y 24 h (99.31%) de exposición. En la concentración mayor ensayada (C3), la eficiencia obtenida fue inferior, acumulando 71.81% y 72.62% luego de ser expuesta durante 12 y 24 h (Fig. 47). Como puede observarse en la Tabla 13 la concentración de Pb registrada al inicio del ensayo (0 min) con respecto a la obtenida en el sobrenadante en todos los tratamientos y tiempos testeados fue significativamente diferente (ANOVA MR, $p < 0.01$).

Al igual que en los ensayos con cobre, se obtuvieron correlaciones negativas significativas entre la concentración final de Pb registrada en las microalgas y en el sobrenadante, lo que demuestra la elevada capacidad de *C. vulgaris* para retener iones metálicos. Porcentajes inferiores de remoción fueron obtenidos por Ferreira y col. (2011) empleando biomasa seca de *C. vulgaris*, quienes obtuvieron un máximo de 86.5% luego de 2 h de exposición a una concentración superior a la ensayada en este trabajo (0,5 mM = 103.6 mgL⁻¹). Por lo tanto, con el empleo de microalgas vivas y concentraciones inferiores de Pb (1.951 a 4.83 mgL⁻¹) obtuvimos mayor eficiencia de remoción.

Arunakumara y col. (2007), encontraron que concentraciones bajas de Pb (0.5-1.0 mgL⁻¹) estimularon el crecimiento de la cianobacteria *Synechocystis* sp. luego de ser expuesta durante 48 h. Transcurrido este período las concentraciones de Pb remanentes en las soluciones acuosas fueron de 0.424, 0.763 y 1.722 mgL⁻¹, luego de exponerlas a concentraciones iniciales de 2, 4 y 6 mgL⁻¹, respectivamente. En nuestro trabajo observamos mayor eficiencia de remoción en un tiempo inferior, obteniéndose en el sobrenadante 0.026 mgL⁻¹ y 1.134 mg L⁻¹ luego de 1 h y 24 h de exposición, partiendo de concentraciones iniciales de Pb similares (1.951 y 4.83 mgL⁻¹) (Tabla 13).

Ferreira y col. (2011) demostraron que rangos de pH entre 4.0 y 6.0 fueron óptimos para la adsorción de metales, aunque el Pb puede precipitar cuando éste alcanza el límite superior propuesto (pH = 6.0). En este trabajo, los valores promedios de pH obtenidos al iniciar y finalizar los ensayos de remoción variaron entre 4.89 (± 0.65) y 3.37 (± 0.84). Bajo estas condiciones se promueve la disociación de los grupos funcionales y la unión de iones metálicos a las superficies celulares, evitando de este modo la precipitación de plomo.

6.3.- Ensayos con Cr. Test de inhibición del crecimiento y eficiencia de remoción de *C. vulgaris*

En el capítulo anterior se pudieron apreciar los efectos directos del Cr sobre atributos de historia de vida de tres especies de cladóceros, en tanto que en el presente capítulo se demuestran los efectos sobre el crecimiento de *C. vulgaris* y su eficiencia para remover este metal de efluentes industriales. En este sentido, los valores de CE_{50} obtenidos en los ensayos con Cr disminuyeron con el incremento en el tiempo de exposición, obteniéndose 4.01, 3.44 y 0.87 mgL^{-1} a las 24, 48 y 72 h, respectivamente (Tabla 15). A su vez, este metal afectó negativamente la tasa de crecimiento tanto a las 48 h como a las 72 h, observándose diferencias significativas con respecto al control cuando fueron expuestas a 0.40 (C4), 0.80 (C5) y 1.60 (C6) mgL^{-1} (Fig. 51).

Considerando los resultados obtenidos en campo (Capítulo I), el Cr estuvo presente siempre en concentraciones superiores con respecto a Cu, Pb y As en las muestras de agua analizadas, alcanzando concentraciones máximas que superaron 137 y 143 veces los Niveles Guía propuestos por la subsecretaría de Recursos Hídricos República Argentina (2003 a). En dichas oportunidades obtuvimos valores mínimos de riqueza de Cladóceros y Rotíferos por lo que consideramos importante remarcar la importancia de controlar y remover el Cr de los efluentes antes de ser vertido a los sistemas acuáticos. Diferentes tecnologías son aplicadas actualmente con esta finalidad, entre ellas la precipitación química, la coagulación, el intercambio iónico, tecnologías de membrana, adsorción, entre otras. Aunque el método convencional más utilizado es su reducción a Cr^{+3} disminuyendo el pH a 2, e incrementándolo luego a 9 - 10 con $Cr(OH)_3$ para su posterior precipitación. La desventaja de esta técnica radica en la disposición final de los barros generados (Miretzky y Fernández Cirelli, 2010).

El concepto de tratamiento de efluentes integrado por los sistemas "bacterianos-algáceos" fue creado por William Oswald en la década del 60'. La alta eficiencia de estas aplicaciones biotecnológicas está relacionada con la capacidad que presentan las microalgas de generar oxígeno a través de la fotosíntesis, este gas es utilizado en la oxidación bacteriana de residuos orgánicos, obteniéndose de tal oxidación sedimentos orgánicos, CO_2 , amonio y fosfato, compuestos utilizados por las microalgas en diferentes procesos biológicos.

En esta tesis los ensayos de remoción de Cr fueron realizados con efluentes industriales que presentaban cierta carga controlada de microorganismos, entre ellos bacterias filamentosas. Luego de agregar en dicho efluente a las microalgas (*C. vulgaris*) se obtuvo máxima eficiencia de remoción de Cr en las diluciones que presentaban las mayores concentraciones (4.87 mgL^{-1} [D1] y 3.158 mgL^{-1} [D2]), removiendo 88.56 % (12 h), 92.12 % (24 h) y 93.81 % (48 h), y 95.08 % (12 h), 96.61 % (24 h) y 98.80 % (48 h) respectivamente. Contrariamente, los porcentajes más altos de remoción en D3 (0.424 mgL^{-1}) se obtuvieron a las 48 h, acumulando 52.71 %. Se

registraron diferencias significativas cuando se comparó el % removido entre las tres diluciones ensayadas (ANOVA-MR, $p < 0.0001$).

En D1 y D2 se registraron correlaciones negativas significativas entre la concentración final de Cr en las microalgas y en el efluente, mientras que en D3 hubo correlación positiva y no significativa. *C. vulgaris* mostró una eficiencia de remoción similar entre los tiempos ensayados ($p=0.117$).

El pH de la solución acuosa tiene influencia en la especiación del Cr y la disociación de grupos funcionales activos. Los estados trivalente y hexavalente son los más estables y frecuentes, se diferencian en términos de movilidad, biodisponibilidad y toxicidad (Panda y Parta, 1997). Si bien el Cr^{+3} es el empleado habitualmente en el curtido del cuero, bajo ciertas condiciones (incremento de oxígeno por ejemplo) puede oxidarse a Cr^{+6} , siendo éste último más tóxico y soluble. A su vez, la adsorción de este metal está asociada con el pH de la solución. A pH bajo (< 2), los grupos funcionales presentes en la superficie del material adsorbente están protonados y restringen el acercamiento de las especies catiónicas como resultado de las fuerzas de repulsión. A medida que aumenta el pH, la protonación decrece y los grupos funcionales se convierten en grupos cargados negativamente. Un aumento en el pH lleva a una disminución de la concentración de Cr^{+3} y otras especies importantes, como ser CrOH^{2+} que son atraídos por los grupos funcionales con carga negativa. Según los resultados obtenidos en este trabajo, los valores promedios de pH registrados en el efluente fueron 6,84 ($\pm 0,87$) y 7,06 ($\pm 1,3$), similares al iniciar y finalizar los ensayos ($p = 0,09$). Considerando el hecho de que la eficiencia de remoción de Cr^{+6} aumenta con la disminución del pH (Singh y col., 2012), y que la eficiencia de remoción de Cr^{+3} aumenta con el incremento de pH, según Miretzky y Fernández Cirelli (2010) la eficiencia de remoción de Cr total es máxima a pH 4.5, dependiendo del tiempo de contacto.

En la fracción de efluentes tratados con procedimientos físicos y químicos, tomado en el momento previo al ingreso del reactor biológico (tratamiento bacteriano) (D1), las microalgas redujeron 15.7 veces su concentración inicial (4.87 mgL^{-1}), registrándose luego de las 48 h de exposición una concentración final de 0.309 mgL^{-1} . Mayor eficiencia aún se registró cuando las microalgas fueron expuestas al efluente obtenido luego de diluir D1 al 50 %, donde lograron reducir 81 veces su concentración inicial (3.158 mgL^{-1}), obteniéndose luego de las 48 h concentraciones marcadamente inferiores de Cr (0.039 mgL^{-1}). La última dilución ensayada corresponde al efluente tratado previamente en el reactor biológico, clarificado luego en un sedimentador secundario, para ser transferido finalmente a la cámara de cloración (Mayol y Hammerly, 2012). Ésta dilución (D3) es vertida al curso receptor (Río Salado) con una concentración de Cr de 0.424 mgL^{-1} . La eficiencia de remoción obtenida al exponer durante 48 h a las microalgas fue mínima, logrando reducir sólo 2.82 veces su concentración inicial, y obteniendo una concentración final de 0.150 mgL^{-1} (Fig. 49).

Como resultado de los análisis efectuados por la tesista en cada uno de los efluentes facilitados por el personal del CPE S.A., pudimos evidenciar que las tecnologías implementadas logran reducir la concentración de Cr 17.42 veces desde que el efluente ingresa a la planta, con una concentración media de 7,387 (\pm 0,134) mgL⁻¹, hasta que sale hacia el curso receptor, con una concentración de 0.424 (\pm 0,071) mgL⁻¹. El tratamiento biológico (bacteriano) reduce 11,48 veces la concentración de Cr. Según los resultados obtenidos en esta tesis, la incorporación de *C. vulgaris* en el proceso de remediación, logró reducir a escala de laboratorio 23.9 (en D1), 189.41 (en D2) y 49.24 (en D3) veces las concentraciones de Cr con las que el efluente ingresa a la planta. Cabe destacar además que los valores obtenidos en esta tesis (concentraciones de Cr registradas para cada etapa) coinciden con los datos aportados a posteriori por el personal técnico y administrativo de la planta.

6.4.- Ensayos con Atr. Test de inhibición del crecimiento y eficiencia de remoción de *C. vulgaris*

Larsen y col. (1986) registraron para el fitoplancton concentraciones efectivas (50 %) de 0.017 mgL⁻¹ a las 24 h de exposición. En este trabajo se obtuvieron valores superiores tras exponer *C. vulgaris* 24 h a Atr (0.31 mgL⁻¹), aunque la sensibilidad fue disminuyendo con el incremento en el tiempo de exposición, a las 48 h (EC₅₀: 2.64), y finalmente aumentando a las 72 h (1.05 mgL⁻¹).

A su vez, a medida que se incrementaron las concentraciones y el tiempo de exposición los efectos negativos sobre la división celular fueron más evidentes. Se encontraron diferencias significativas en la tasa de crecimiento con respecto al control cuando se expuso *C. vulgaris* durante 48 h a la mayor concentración (0.32 mgL⁻¹), mientras que a las 72 h se registraron efectos desde 0.02 mgL⁻¹ (C2) y en todas las concentraciones superiores testeadas (ANOVA MR, $p < 0.01$) (Fig. 52). González Barreiro y col. (2006) registraron efectos negativos significativos sobre la tasa de crecimiento luego de exponer a *C. vulgaris* durante 24 h a 0.161 mgL⁻¹ de Atr, aunque no se vio afectada su viabilidad celular.

Van Der Heever y Grobbelaar (1996) observaron que concentraciones inferiores de Atr (0.17 µgL⁻¹) inhibían el 10 % del crecimiento algal, siendo *Selenastrum capricornutum* la especie más sensible, en tanto que *Chlamydomonas eugametos* resultó ser la más resistente (NOEC de 500 µgL⁻¹ (Loeppky y Tweedy, 1969). Según Woolhouse (1981) y Forney y Davis (1981) los efectos de la atrazina se manifiestan principalmente mediante la inhibición de la fotosíntesis, bloqueando el transporte de electrones del Fotosistema II.

Es importante considerar que la respuesta de las microalgas ante la acción tóxica de la atrazina depende del tiempo de persistencia de la misma, ya que según Solomon y col. (1996) pueden recuperarse de los efectos tóxicos cuando la duración de la exposición no es demasiado prolongada. Por lo tanto, sólo se esperan efectos secundarios adversos en los

eslabones tróficos superiores cuando la exposición es lo suficientemente larga. Por su parte, Jurgensen y Hoagland (1990), en un estudio de campo observaron que exposiciones de corta duración (24 h) a una concentración de $100 \mu\text{gL}^{-1}$ de Atr no provocaron efectos significativos sobre la biomasa y abundancia del perifiton. Sin embargo, Hamala y Kollig (1985) observaron cambios permanentes en la estructura de las comunidades algales de agua dulce luego de un período de exposición de 14 días a $100 \mu\text{gL}^{-1}$.

Según Tang y col. (1998), la absorción de la atrazina ocurre rápidamente, siendo más eficientes las clorófitas que las diatomeas. En el presente trabajo *C. vulgaris* mostró baja eficiencia para remover Atr, sólo 11,16 % y 51,39 % cuando se expuso a $43.9 \text{ (C1)} \mu\text{gL}^{-1}$ y $131 \text{ (C2)} \mu\text{gL}^{-1}$ respectivamente (Fig. 50). Aunque se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones iniciales y finales y los % acumulados en dichas concentraciones (ANOVA-MR $p < 0.05$). Según Solomon y col. (1996), la escasa capacidad de remoción de la Atr en agua dulce se debe principalmente al bajo coeficiente octanol agua ($\log K_{ow} = 2,68$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$), y a su rápida metabolización y excreción. También Weiner y col. (2004) afirmaron que las diferencias obtenidas en la eficiencia de acumulación de este herbicida por las microalgas se explica por una compleja interacción entre varios factores metabólicos.

Contrariamente, González Barreiro y col. (2006) obtuvieron una mayor eficiencia de remoción al exponer a *C. vulgaris* durante 12 h a concentraciones de Atr similares a las empleadas en este trabajo: registrando 83 % y 90 % de remoción cuando fueron expuestas a $161.77 \mu\text{gL}^{-1}$ y $21.57 \mu\text{gL}^{-1}$ respectivamente. Posiblemente dicha diferencia pueda deberse a que estos autores emplearon soluciones con una mayor concentración de células ($9 \times 10^6 \text{ cél.mL}^{-1}$) que la ensayada en este trabajo ($1 \times 10^6 \text{ cél.mL}^{-1}$)

6.5.- Ensayos con End. Test de inhibición del crecimiento y eficiencia de remoción de *C. vulgaris*

Las concentraciones efectivas obtenidas en los ensayos con End para el 50 % de la población disminuyeron con el incremento en el tiempo de exposición, registrando valores de CE_{50} de 40.58, 23.67 y 1.48 mgL^{-1} a las 24, 48 y 72 h, respectivamente. La tasa de crecimiento de *C. vulgaris* fue significativamente diferente con respecto al control en las concentraciones mayores de End (4 mgL^{-1} (C5) y 8 mgL^{-1} (C6)) a las 48 h, mientras que a las 72 h se observaron efectos negativos significativos en todas las concentraciones ensayadas (ANOVA MR, $p < 0.01$) (Fig. 52). Resultados similares obtuvieron Knauf y Schulze (1973), quienes registraron efectos adversos sobre la tasa de crecimiento de esta especie al exponerla a concentraciones superiores a 2 mgL^{-1} . Mohapatra y Mohanty (1992), obtuvieron una CE_{50} para *C. vulgaris* de 41.5 mgL^{-1} . Estos autores no observaron respuestas adversas en períodos cortos de exposición y consideran que el retraso en la inhibición del crecimiento podría estar vinculado con la elevada eficiencia de acumulación que presentan las células de *C. vulgaris*.

Chlorella vulgaris mostró mayor eficiencia para remover End que Atr. No se encontraron diferencias significativas entre los porcentajes removidos de End en las diferentes concentraciones ensayadas (ANOVA-MR, $p= 0.7301$), acumulando 95.34 %, 94.93 % y 95.93 %, en C1, C2 y C3 respectivamente (Fig. 50). A su vez, se encontraron diferencias extremadamente significativas entre las concentraciones iniciales y finales (ANOVA-MR, $p<0.0001$) (Tabla 14).

Actualmente es escasa la información disponible sobre la eficiencia de diferentes organismos para remover endosulfán de medios acuosos. Algunos estudios evalúan la capacidad de las bacterias para degradar endosulfán en suelo (Kumar y Philip, 2006). Sung-Eun y col., (2003) estudiaron la capacidad que presentan diferentes especies de *Anabaena* de biotransformar moléculas de endosulfán, demostrando que podrían contribuir en los procesos de remediación del suelo.

Oeser y col. (1971) analizaron la capacidad de degradar End en agua que presenta *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp.. De Lorenzo y col. (2002) estudiaron el potencial de *Pseudokirchneriella subcapitatum* y de *Daphnia magna* para secuestrar End, y analizaron también procesos de bioacumulación de un nivel trófico al otro. A las 96 h registraron una CE_{50} de 0.427 mgL^{-1} para *P. subcapitatum* y un factor de bioconcentración (FBC) de 2,682 cuando fueron expuestas a $100 \text{ } \mu\text{gL}^{-1}$ durante 16 h. Éste fue acumulado rápidamente por ambos organismos, aunque no se observó transferencia desde un nivel trófico al otro. Estos autores postulan que *P. subcapitatum* tuvo mayor afinidad de absorción que el registrado por Rao y Lal (1987) empleando *Anabaena* sp. y *Aulosira fertilissima*.

Según De Lorenzo y col. (2002) las microalgas que presentan elevados porcentajes de lípidos son más eficientes para concentrar tanto endosulfán como otros xenobióticos lipofílicos. Por lo tanto, podemos inferir que la elevada eficiencia de remoción obtenida en este trabajo está directamente relacionada con el gran contenido lipídico que presenta *C. vulgaris* (38 %) (Liang y col., 2009) en relación con otras especies de microalgas (Por ej. *Navicula* sp.: 23.1 %; *Pseudokirchneriella subcapitatum*: 16.7%) (Kent y Currie, 1995; De Lorenzo y col., 2002)

6.6.- Ensayos con Gly. Test de inhibición del crecimiento algal

Los resultados obtenidos indicaron que en las primeras horas de exposición el glifosato estimuló significativamente la división celular de *C. vulgaris*. Este patrón de estimulación temprana por sustancias tóxicas (también llamado "hormesis") es similar al reportado por otros investigadores (Calabrese y col., 1999; Sáenz y col., 2012). Sin embargo, consideramos que es necesario profundizar sobre esta temática para entender claramente los mecanismos ocurridos en este tipo de estimulación. A pesar de este efecto temprano, después de las 72 h de exposición todas las concentraciones ensayadas con el formulado ESKOBA® finalmente afectaron negativamente la tasa de crecimiento de *C. vulgaris*. Las concentraciones efectivas

registradas se incrementaron con el tiempo de exposición: 4, 9.12 y 58.59 mg L⁻¹ a las 24, 48 y 72 h, respectivamente.

Mediante la comparación de la sensibilidad de *C. vulgaris* con la de otras Chlorophyceae expuestas a formulados comerciales de glifosato, se observó que la CE₅₀ obtenida en nuestro trabajo fue mayor a la registrada por otros investigadores: Tsui y Chu (2003) obtuvieron a las 96 h valores de EC₅₀ de 5.81 mgL⁻¹ para *Selenastrum capricornutum* expuestos a Roundup®, en tanto que Romero y col., (2011) registraron CE₅₀ de 55.62 mgL⁻¹ luego de exponer a *C. kessleri* al formulado ATANOR® durante 96 h. Contrariamente, los estudios llevados a cabo por Sáenz y Di Marzio (2009) demostraron valores aún superiores de CE₅₀ en diferentes especies de microalgas expuestas a Roundup® durante 96 h, con rangos que van desde 120 hasta 154 mgL⁻¹. El orden de sensibilidad registrado por estos autores (*Scenedesmus quadricauda* > *S. acutus* > *C. vulgaris* > *Raphidocelis subcapitata*) sugiere que la especie aquí estudiada presenta una tolerancia relativamente alta al glifosato. Estos resultados reflejan que la sensibilidad de las microalgas al glifosato difiere entre las especies y es altamente dependiente de la composición química de los formulados ensayados. Dicha información no se encuentra disponible en el marbete de los productos que se comercializan, con la consiguiente incerteza acerca de la potencial toxicidad para las especies no blanco (Cox, 2004). Esta situación dificulta el correcto establecimiento de los niveles guías para la protección de la biota acuática.

Finalmente, varios autores han brindado información sobre diferentes mecanismos empleados por las microalgas cuando son expuestas a contaminantes; tales estrategias se relacionan particularmente con la síntesis de fitohormonas y reguladores del crecimiento (poliaminas) que cumplen roles importantes en el desarrollo de las mismas; además pueden modificar la eficiencia de biosorción de metales pesados (Piotrowska-Niczyporuk y col. 2012). Recientemente, Bajguz (2011) estudió el efecto de fitohormonas sobre el crecimiento de *C. vulgaris*, además evaluó la capacidad de acumular metales y las variaciones en los niveles celulares de fitoquelatinas, clorofila, monosacáridos y proteínas, confirmando que los metales pueden provocar una variedad de respuestas adaptativas. En este sentido, Mallick (2004) describió mecanismos tales como la formación de complejos intracelulares y procesos de detoxificación que facilitan el almacenamiento de los mismos y podrían modificar la remoción. Por otra parte, varios estudios han demostrado que *Chlorella* spp. produce niveles elevados de fitoquelatinas, carotenoides y enzimas antioxidantes cuando se expone a los metales (Rai y col., 2004). Estas biomoléculas protegen las organelas y al metabolismo celular de los efectos tóxicos.

Por todo lo anteriormente expuesto, se concluye que C. vulgaris es una microalga eficiente para disminuir concentraciones de Cu, Pb, Cr y End desde el orden de ppm al de ppb de soluciones acuosas y de efluentes industriales, por lo que se recomienda en tratamientos de aguas residuales para pruebas a mayor escala.

7.- CONCLUSIONES GENERALES

7.1.- Contexto ambiental. La ecotoxicología y sus herramientas de análisis para el control y monitoreo

● Del análisis de los resultados entregados, se visualiza una relación inversa entre la riqueza de zooplancton y la concentración de metales y plaguicidas en el agua de los arroyos estudiados. La riqueza de cladóceros y rotíferos fue mínima en los meses de agosto y septiembre de 2011, en tanto que los máximos registros correspondieron a febrero y marzo de 2012. En 2012 se registraron los valores mínimos de conductividad y de pH en S 2, 3 y 4, los valores máximos de fósforo reactivo soluble y de carbono orgánico total y las precipitaciones fueron máximas. Todos estos parámetros mostraron diferencias significativas cuando fueron comparados con los valores de agosto y septiembre de 2011, en forma coincidente con la riqueza específica de zooplancton más baja. A su vez en febrero-marzo de 2012, con máxima riqueza de zooplancton, las concentraciones de plaguicidas en agua no superaron los niveles guía, en tanto que las de metales y As en agua los superaron levemente y en sedimento sólo el Pb se encontró en niveles superiores a los estándares permitidos.

● Las máximas concentraciones de metales pesados registradas en agua afectaron negativamente al zooplancton, ya que coincidieron con los valores mínimos observados de riqueza de rotíferos y cladóceros. Posiblemente valores extremos de conductividad, pH y la carga de contaminantes orgánicos, estimados indirectamente a través de la DQO y DBO, también fueron determinantes en la riqueza de rotíferos, cladóceros y copépodos relevados. Es importante considerar que en este estudio no se analizaron concentraciones de plaguicidas en sedimento. Tampoco se cuenta con registros de otros pesticidas ampliamente utilizados a nivel regional, como por ejemplo el Glifosato o el Clorpirifós, que probablemente también ejerzan efectos directos e indirectos sobre la biota acuática.

● Las concentraciones de metales y As en agua no fueron diferentes entre los cuatro sitios estudiados, aunque sí hubo diferencias significativas en la carga de metales y As en el sedimento de cada uno de ellos, concentraciones que además fueron diferentes entre los meses estudiados. Las concentraciones de Cr en agua siempre fueron superiores a las de Cu, Pb y As. Hubo mayor variabilidad temporal en las concentraciones de metales y As registradas en agua en S 1 y 4 con respecto a S 2 y 3.

● Las concentraciones de plaguicidas no mostraron ser significativamente diferentes entre los cuatro sitios, en tanto que las variaciones temporales dependieron posiblemente de la intensidad de las pulverizaciones y de las precipitaciones. La Atrazina en agua estuvo presente en concentraciones superiores que el endosulfán, aunque nunca sobrepasó los niveles guía, mientras que el endosulfán los superó.

● Los ciclos estacionales no influyeron de manera significativa en la riqueza de rotíferos, cladóceros y copépodos ya que la comparación entre las cuatro estaciones no mostraron diferencias significativas.

● En el canal Santa María se obtuvieron valores bajos de Clorofila *a* (promedio anual de $2.5 \mu\text{gL}^{-1}$) con rangos mínimos registrados en agosto de 2011 ($0,1 \mu\text{gL}^{-1}$) y máximos en febrero de 2012 ($15 \mu\text{gL}^{-1}$). Estos valores fueron levemente superiores en el sitio cuatro correspondiente al A° Colastiné ($9,1 \mu\text{gL}^{-1}$) en tanto que en los sitios tres y dos los promedios anuales fueron máximos ($26,7$ y $43,9 \mu\text{gL}^{-1}$ respectivamente). Se encontraron variaciones estacionales al comparar los meses de primavera-verano y a otoño-invierno. No hubo diferencia significativa entre los cuatro sitios en cuanto a la disponibilidad de nutrientes limitantes (nitratos, nitritos y fósforo) para los organismos fototróficos.

● Al cuantificar la riqueza de especies por grupo (Rotifera, Cladocera y Copepoda) se obtuvo un total de 76 taxa de los cuales el 80,26 % correspondió a rotíferos y el 19,74 % a cladóceros. La riqueza de especies registrada en los diferentes sitios siguió el orden: S4>S3>S2>S1. En el canal Santa María (S1) estuvo representado el 40,98 % del total de las especies de rotíferos, en el A° Corralito (S2) el 59,01 %, y en los dos tramos estudiados del A° Colastiné (S3 y S4) el 67,21 % y 83,6 %. Con respecto a los cladóceros, en S1 estuvo representado el 6,6 %, mientras que en S2, S3 y S4 el 53,33 %, 60 % y 86,6 % respectivamente. Se encontró mayor frecuencia de aparición de copépodos Harpacticoides que de Cyclopoideos y Calanoideos.

● Este trabajo brinda información que puede ser considerada para rever los niveles guías establecidos a nivel nacional e internacional para la protección de la biota acuática, aportando herramientas que permitan regular el uso y aplicación de plaguicidas. En este sentido, las entidades gubernamentales deberían producir reglamentaciones que restrinjan, reduzcan y regulen su empleo en tierras agrícolas, particularmente aquellas adyacentes a cursos de agua y a poblaciones rurales.

● Además resulta evidente que deberían controlarse rigurosamente los desechos industriales antes de ser volcados a los sistemas acuáticos, apoyando el desarrollo de tecnologías adecuadas de remediación de efluentes enriquecidos con metales pesados. Este estudio pone en evidencia que las concentraciones registradas, tanto de plaguicidas como de metales pesados, en numerosas ocasiones excedieron ampliamente los niveles guía. Por lo tanto, es muy importante profundizar en el conocimiento de su efecto sobre las comunidades acuáticas con el propósito de que sean considerados como herramientas a la hora de establecer niveles estándares de protección de la biota nativa y fortalecer estrategias de control a nivel local y regional.

● Destacamos la necesidad de impulsar una ley Nacional de control fitosanitario que priorice las “buenas prácticas agrícolas”, es decir que abarque todo el ciclo de producción,

desde la aplicación, hasta la disposición final de los envases y del cultivo tratado, basándose en información científica relevante. Consideramos de suma importancia que se tenga en cuenta en la elaboración de normativas las distancias mínimas a las que deben aplicarse plaguicidas de acuerdo a diferentes condiciones climáticas en el momento de aplicación (velocidad y dirección del viento, temperatura, humedad, momentos del día, etc.). Respecto a esto, sólo registramos una normativa Nacional del año 1964 (Disp. Conj. N° 253/64, 1964) que menciona velocidades de viento bajo las cuales no deberían realizarse aplicaciones para evitar peligros potenciales a cultivos no blanco y animales que se hallen en las inmediaciones.

- Sostenemos que es indispensable que los diferentes municipios y comunas de la provincia de Santa Fe se comprometan en el abordaje de esta temática con la elaboración de reglamentaciones que involucren las responsabilidades que impone la Ley 11.273, teniendo en cuenta las necesidades, problemáticas y características propias de cada lugar.

- Además consideramos que debería ser obligatorio, tanto a nivel internacional como nacional, permitir sólo la comercialización de pesticidas que incluyan en sus marbetes a todos los ingredientes de la formulación, incluyendo componentes inertes, coadyuvantes o sustancias auxiliares que pueden aumentar significativamente los efectos neurotóxicos, genotóxicos y de perturbación endócrina en organismos no blanco.

- En cuanto a medidas de protección ambiental es recomendable tener en cuenta el establecimiento de áreas buffer o amortiguadoras para la aplicación de fitosanitarios cerca de los cuerpos de agua dulce superficial, a los fines de evitar su contaminación por deriva; además de intensificar el control por parte de los organismos oficiales, para impedir el avance de la agricultura en áreas naturales.

- Finalmente, y como consecuencia del análisis del contexto ambiental realizado en esta tesis, se acepta la **Hipótesis N° 1** planteada: *“En estudios de campo, la diversidad del zooplancton será afectada negativamente por actividades antrópicas (agrícolas e industriales)”*.

7.2.- Ensayos de toxicidad en laboratorio. Aplicación de técnicas de microscopía electrónica y microanálisis

- Mediante el estudio de parámetros biológicos altamente representativos de la salud ambiental se comprobaron alteraciones causadas por la exposición a Cu, Cr y Pb, sobre el ciclo de vida de *D. magna*, *M. macleayi* y *C. dubia*. Los ensayos agudos mostraron el siguiente orden decreciente de toxicidad: Cu > Cr > Pb para las tres especies, que tuvieron el siguiente orden de sensibilidad: *C. dubia* > *D. magna* > *M. macleayi* para Cu y Cr, y *C. dubia* > *M. macleayi* > *D. magna* para Pb. Los ensayos de ciclo de vida y en algunos casos los tests agudos demostraron que *M. macleayi* es más sensible a los metales que *D. magna*, y menos que *C. dubia*. Teniendo en cuenta estos resultados y considerando su amplia distribución en las

regiones tropicales, subtropicales y templadas, se propone a esta especie como organismo test en pruebas de toxicidad de los sistemas acuáticos continentales en la región.

- Para evaluar la toxicidad de metales pesados y las limitaciones establecidas en las distintas normativas se deberían tener en cuenta resultados obtenidos en ensayos agudos y crónicos con especies de importancia regional y diferentes tóxicos, para no subestimar los posibles efectos sinérgicos. A su vez se deben establecer condiciones más definidas de ensayos y de cultivo de cladóceros con el fin de reducir la variabilidad en los resultados.

- En función de los resultados obtenidos se observó a partir de SEM que las microalgas expuestas a metales mostraron pérdida en diferentes grados de su morfología y del contenido citoplasmático con desorganización de estructuras; pudieron visualizarse restos de paredes celulares, fragmentos celulares y autosporas libres. Si bien se registró la presencia Cr, Cu y Pb no se pudieron determinar zonas de depósito de estos metales, mediante la técnica de microanálisis XEDS. Las concentraciones estuvieron cercanas al límite de detección del equipo, motivo por el cual se concluyó que esta técnica no resulta conveniente para cumplir con el objetivo propuesto, al menos en las concentraciones ensayadas, las que son compatibles con la vida de los cladóceros estudiados.

- Las micrografías tomadas con SEM de los epipios en desarrollo y los espectros de energía obtenidos a partir de microanálisis mostraron que las concentraciones de Cr fueron superiores sobre el embrión cuando se la comparó con la presente en la cubierta adyacente. Dichas concentraciones guardaron una relación directa con el incremento de Cr presente en el medio de cultivo; éstas podrían producir efectos genotóxicos en los embriones que allí se encuentran alojados. A su vez, la aplicación de estas técnicas nos permitió conocer los porcentajes atómicos de los elementos constitutivos de *D. magna*: Ca > P > S > Na, en el exoesqueleto de *D. magna*; Ca > S > P > K en el epipio expuesto a 150 µgL⁻¹ de Cr; y por último en el epipio expuesto a 280 µgL⁻¹: Ca > S > P > Na.

- Podemos concluir que los metales empleados además de influir en las poblaciones de cladóceros afectando su ciclo de vida, ocasionaron modificaciones morfológicas y lisis celular en su recurso trófico. La alteración en estos eslabones clave de las tramas tróficas de los sistemas acuáticos continentales, puede repercutir negativamente en poblaciones de peces con larvas y juveniles zooplanctófagos.

- A través del presente trabajo, se busca impulsar el monitoreo biológico, que resulta ser un complemento fundamental al clásico monitoreo físico-químico de los sistemas acuáticos contaminados, ya que la concentración acuosa total de un metal es a menudo un indicador pobre de la biodisponibilidad y, por lo tanto, de la real toxicidad del mismo. Este tipo de conocimiento resulta de gran importancia para interpretar la compleja problemática de la contaminación de sistemas acuáticos continentales y muy especialmente, de sus efectos sobre la biota.

● En síntesis, el análisis de los atributos de historia de vida nos permitió validar la **Hipótesis N° 2**: “Los metales pesados: Cr, Cu y Pb afectan negativamente atributos de historia de vida (fecundidad, crecimiento, sobrevivencia y edad de primera reproducción) de especies de microcrustáceos planctónicos en ensayos de toxicidad agudos y crónicos”.

● Con respecto a la **Hipótesis N° 3**: “Los metales pesados: Cr, Cu y Pb forman depósitos sobre el exoesqueleto, mudas y efipios de *D. magna* y sobre *C. vulgaris*, identificables mediante microfotografías electrónicas y XEDS”, ésta no pudo ser validada completamente, sobre todo considerando los valores registrados en el exoesqueleto de *D. magna* y en las células de *C. vulgaris*, porque si bien se registraron depósitos de metales pesados en estas matrices, los valores se encontraron cercanos al límite de detección del equipo. Aunque en los efipios estos valores fueron superiores a dicho límite y por lo tanto considerados para validarla en parte.

7.3.- Empleo de microalgas en aplicaciones biotecnológicas de remediación y efecto de xenobióticos sobre su crecimiento

● Las concentraciones efectivas obtenidas para Cr y End disminuyeron con el incremento en el tiempo de exposición. El Pb y el Gly mostraron un efecto estimulador, con un aumento de la CE₅₀ a medida que transcurría el período de exposición; la Atr y el Cu mostraron un comportamiento variable, con incremento de la CE₅₀ a las 48 h, y luego con una notable disminución. *C. vulgaris* mostró una sensibilidad acorde con el siguiente orden decreciente de toxicidad a las 72 h: Cu > Cr > Pb y Atr > End > Gly.

● La tasa de crecimiento (μ) de *C. vulgaris* fue afectada en los tratamientos con Cr tanto a las 48 h como a las 72 h, resultados similares se obtuvieron a las 48 h en las microalgas expuestas a Cu. En tanto que a las 72 h mostró ser diferente significativamente en las concentraciones mayores de Cr (C4, C5 y C6) y en todos los tratamientos con Cu con respecto al control. La tasa de crecimiento en los ensayos con la mayor concentración de Pb mostró un efecto estimulador con respecto al control. Se encontraron diferencias extremadamente significativas cuando se comparó μ en los diferentes tiempos de exposición para los tres metales estudiados.

● El incremento de la concentración del herbicida glifosato y la extensión del tiempo de exposición redujeron la tasa de crecimiento de *C. vulgaris*. Luego de 24 h, se observó una leve estimulación de la división celular en la concentración más alta. Contrariamente, a las 72 h ésta fue inhibida de manera significativa en las cinco concentraciones más altas testeadas.

● También el endosulfán y la atrazina afectaron la tasa de crecimiento de *C. vulgaris*. A medida que se incrementaban las concentraciones y el tiempo de exposición los efectos negativos sobre la división celular fueron más evidentes. Se encontraron diferencias significativas con respecto al control en las concentraciones mayores de End (C5 y C6) y de Atr

(C6) a las 48 h, en tanto que a las 72 h todas las concentraciones de End ensayadas tuvieron efectos negativos significativos sobre la tasa de crecimiento. Se registraron además diferencias extremadamente significativas cuando se comparó μ en los diferentes tiempos de exposición para los tres plaguicidas estudiados.

- Pese a los efectos del Cu sobre el crecimiento de *C. vulgaris*, las microalgas resultaron ser muy eficiente en los ensayos de remoción de este metal. Cuando se expuso a la menor concentración acumuló 81.97 %, 92.53 % y 95.28 % luego de 10 min, 12 h y 24 h de exposición, respectivamente. A las 24 h removió 73.94 % y 41.44 % en C2 y C3. Teniendo en cuenta que el pH condiciona la adsorción de iones metálicos, en los ensayos de remoción con Cu los valores promedios se encontraron dentro del rango propuesto por diferentes autores para la obtención de una máxima eficiencia de remoción.

- La eficiencia de remoción de Pb por *C. vulgaris* mostró ser similar en las concentraciones inferiores testeadas, aunque significativamente inferior en C3. *C. vulgaris* removió 50.43% y 47.69% de Pb después de los 10 minutos de exposición, en tanto que transcurrida una hora la eficiencia se incrementó en un 98.74% y 86.89% en C1 y C2, respectivamente. A las 12 h de exposición, el 100% del metal fue acumulado por las microalgas en la concentración menor. Porcentajes máximos de remoción se obtuvieron en C2 a las 12 h (94.56%) y 24 h (99.31%), mientras que en C3 acumuló 71.81% y 72.62%. La eficiencia de remoción fue mayor a la obtenida por otros investigadores que emplearon biomasa seca de *C. vulgaris* (Ferreira y col., 2011).

- *Chlorella vulgaris* mostró ser muy eficiente para remover Cr a partir de efluentes industriales, obteniéndose una máxima remoción en las diluciones con las mayores concentraciones de Cr, acumulado 88.56 % (12 h), 92.12 % (24 h) y 93.81 % (48 h) en D1, y 95.08 % (12 h), 96.61 % (24 h) y 98.80 % (48 h) en D2. Contrariamente, los porcentajes más altos en D3 se obtuvieron a las 48 h (52.71 %). Las tecnologías implementadas en el CPE S.A. logran reducir la concentración de Cr 17.42 veces desde que el efluente ingresa a la planta hasta que sale hacia el curso receptor. Sin embargo, este trabajo demostró que la incorporación de *C. vulgaris* en el proceso de remediación, logró reducir 23.9 (en D1), 189.41 (en D2) y 49.24 (en D3) veces las concentraciones de Cr con las que el efluente ingresa a la planta.

- *Chlorella vulgaris* mostró baja eficiencia para remover Atr, sólo 11,16 % y 51.39 % cuando fue expuesta a 43.9 (C1) μgL^{-1} y 131 (C2) μgL^{-1} respectivamente, aunque se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones iniciales y finales y los % acumulados en las mencionadas concentraciones. La escasa capacidad de remoción pudo deberse posiblemente a la acción de interacciones metabólicas no profundizadas en este trabajo, o bien la concentración de células empleada fue baja.

● *Chlorella vulgaris* mostró mayor eficiencia para remover End que Atr, acumulando 95.34 %, 94.93 % y 95.93 %, en C1, C2 y C3 respectivamente, se encontraron diferencias extremadamente significativas entre las concentraciones iniciales y finales. A pesar de los resultados obtenidos, son escasos los trabajos que analizan la eficiencia de las microalgas para remover endosulfán de medios acuosos. Los elevados porcentajes registrados podrían relacionarse con el alto contenido lipídico que presenta *C. vulgaris*, condición que favorece la bioconcentración de compuestos lipofílicos, entre ellos el endosulfán.

● Finalmente se concluye que *C. vulgaris* es una microalga eficiente para disminuir concentraciones de Cu, Pb, Cr y End desde el orden de ppm al de ppb de soluciones acuosas y de efluentes industriales, por lo que se recomienda en tratamientos de aguas residuales para pruebas a mayor escala.

● Por lo expuesto anteriormente, validamos la **Hipótesis N° 4**. “A escala de laboratorio, *Chlorella vulgaris* acumula metales pesados a partir de efluentes industriales y de soluciones experimentales enriquecidas con Cu y Pb que afectan negativamente su crecimiento poblacional” y la **Hipótesis N° 5**. “A escala de laboratorio, *Chlorella vulgaris* acumula plaguicidas a partir de soluciones enriquecidas con endosulfán y atrazina, que afectan negativamente su crecimiento poblacional”.

8.- REFERENCIAS

- Adema, M. M. (1978) *Daphnia magna* as a test animal in acute and chronic toxicity tests. *Hydrobiol.* 59: 125.
- Ahlstrom, E. H. (1940) A revision of the rotatorian genera *Brachionus* and *Platyas* with descriptions of one new species and two new varieties. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 77: 143-184.
- Ahlstrom, E. H. (1943) A revision of the rotatorian genus *Keratella*, with descriptions of three new species and five new varieties. *Bulletin of the American Museum of Natural History*; 80:(12) 411-457.
- Ahmet, A. S.; Ergönül, M.; Yigit, S. y Baykan, O. (2008) The acute toxicity of lead nitrate on *Daphnia magna*. *African J. of Biotechnol.* 7 (23): 4298-4300.
- Albeliovich, A. (2004) *Water Purification: Algae in wastewater oxidation ponds*. En: *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology* (Ed: Richmond, A.) Blackwell Publishing, Oxford, p. 430-438.
- Álvarez, J. (2010) *Caracterización de las ciénagas de Arcial, Porro y Cintura (río San Jorge) y de Baño Charco Pescao y Pantano Bonito (Río Sinú), departamento de Córdoba*. En: *Colombia, diversidad biótica IX, Ciénaga de Córdoba: Biodiversidad, ecología y manejo ambiental*. (Ed. Rangel, J. O.) Univ. Nacional de Colombia, Bogotá, p. 619.
- Anderson, B. G. (1944) The toxicity thresholds of various substances found in industrial wastes as determined by the use of *Daphnia magna*. *J. Sewage Works* 16 (6): 1156.
- Anderson, D. H. y Benke, A. (1994) Growth and reproduction of the cladoceran *Ceriodaphnia dubia* from a forested floodplain swamp. *Limnol. and Oceanograp.* 39 (7): 1517-1527.
- Antunes, S. C.; Pereira, R. y Gonçalves, F. (2007) Acute and chronic toxicity of effluent water from an abandoned uranium mine. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 53: 207-213.
- APHA (American Public Health Association) (1975) (DQO) *Method 410.1, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 1975*, 45th Ed. Amer. Public. Health Assoc., Americ Water Works Association, Water Poll. Control Federation, Washington D.C. p. 550.
- APHA (American Public Health Association) (1975) (TOC). *Method 415.1, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 1975*, 14th Ed. Amer. Public. Health Assoc., Americ Water Works Association, Water Poll. Control Federation, Washington D.C. p. 532.
- APHA (American Public Health Association) (1975) *B (STS) Method 160.3. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 14th Ed. P. 91, Method 208A, (1975). American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation.
- APHA (American Public Health Association) (1980) (DBO) *Method 405.1, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 1980*. 15th Ed. Amer. Public. Health Assoc., Americ Water Works Association, Water Poll. Control Federation, Washington D.C. p. 83.
- APHA (American Public Health Association) (1998) (NO_3^- , NO_2^- y PRS) *Técnicas SM 4500-P-E, SM 4500- NO2-B y SM 4500- NO3-D. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 1998*, 20th Ed. Amer. Publ. Health Assoc. (Environmental Protection Agency, 1999).
- APHA (American Public Health Association) (1998) *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 20th Ed. American Public Health Association. Ap. 8010G, Washington D.C., USA.
- APHA (American Public Health Association); AWWA (American Water Works Association); y WEF (Water Environment Federation) (1976) *Standard methods for the examination of water and wastewater* 20th Ed. Washington DC, USA.
- APHA (American Public Health Association), AWWA (American Water Works Association) y WEF (Water Environment Federation) (1988) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* 20th Ed. APHA, Washington, DC, USA.
- Aranguren, N. (2010) *Diversidad taxonómica de cladóceros y copépodos planctónicos de Colombia: Análisis local y regional*. Tesis doctoral. Univ. Nacional de Colombia, Bogotá, p. 110.

- Arunakumara, K. ; Xuecheng, Z. y Song, X. (2007) *Comparative study on bioaccumulation of lead and cadmium by the cyanobacterium Synechocystis sp. PC 6803 under laboratory conditions*. *Ciencias marinas*, 33 (3): 271-280.
- Baird, D. J.; Barber, I.; Bradley, M.; Callow, P. y Soares, A. (1989) *The Daphnia bioassay: a critique*. *Hydrobiol.*, 188: 403-406.
- Bajguz, A. (2011) *Suppression of Chlorella vulgaris Growth by Cadmium, Lead, and Copper Stress and Its Restoration by Endogenous Brassinolide*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 60: 406–416.
- Barata, C.; Baird, D. J. y Markich, S. J. (1998) *Influence of genetic and environmental factors on the tolerance of Daphnia magna Straus to essential and non-essential metals*. *Aquat. Toxicol.*, 42: 115–137.
- Baron, M.; Arellano, J. B. y Gorge, J. L. (1995) *Copper and photosystem-II—a controversial relationship*. *Physiol. Plant.* 94: 174–180.
- Barón-Rodríguez, M.; Gavilán, R. y Ramírez, J. J. (2006) *Variabilidad espacial y Temporal en la comunidad de cladóceros de la Ciénaga de Paredes (Santander, Colombia) a lo largo de un ciclo anual*. *Limnética*, 25 (3): 624-635.
- Baudo, R. (1987) *Heavy metal Pollution and ecosystem recovery*. En: *Ecological assessment of environmental degradation, pollution and recovery* (Ed.: Ravera, O.). Elsevier Scientific Publisher BV Amsterdam, The Neatherlands, p.325.
- Baudouin, M. F. y Scoppa, P. (1974) *Acute toxicity of various metals to freshwater zooplankton*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 12 (6): 745-751.
- Belanger, S. E.; Farris, J. L. y Cherry, D.S. (1989) *Effects of diet, water hardness, and population source on acute and chronic copper toxicity to Ceriodaphnia dubia*. *Archive of Environ. Contam. and Toxicol.* 18: 601–611.
- Beyers, D.W.; Rice, J.A.; Clements, W.H. y Henry, C.J. (1999) *Estimating physiological cost of chemical exposure: integrating energetics and stress to quantify toxic effects in fish*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 56: 814.
- Bonetto, A. A. (1994) *Austral rivers of South America in Limnology Now: a paradigm of planetary problems*. Eds.: R. Margalef, Elsevier Science B.V, 425.
- Bossuyt, B. y Janssen, C. R. (2005) *Copper toxicity to different field-collected cladoceran species: intra- and inter-species sensitivity*. *Environ. Pollut.* 136-145.
- Brooks, J. L. (1959) *Cladocera*. En: *Freshwater biology* (Ed.: Edmondson, W. T.), 2nd Ed. Wiley, NewYork, pp, 587-656.
- Buikema, A. L. Jr.; Niederlehner, B. R. y Cairns J. Jr. (1982) *Biological monitoring. Part IV. Toxicity testing*. *Water Research* 16: 239 - 262.
- Bywater, J.; Banackowski, R. y Bailey, M. (1991) *Sensitivity to uranium of six species of tropical freshwater fishes and four species of cladocerans from Northern Australia*. *Environ. Toxicol. Chem.* 10(11): 1449–1458.
- Calabrese, E. J.; Baldwin, L. A. y Holland, C. D. (1999) *Hormesis: A highly generalizable and reproducible phenomenon with important implications for risk assessment*. *Risk Anal* 19: 261–281.
- Canadian Environmental Quality Guidelines (2003) Canadian Council of Ministers of the Environment. Ottawa, Ontario, Canada.
- Carruyo-Noguera, J.; Reyes, J.; Casler, C. y Reverol, Y. (2004) *Cladóceros (Crustacea, Branchiopoda) de la laguna de Kunana, sierra de Perijá, estado Zulia, Venezuela*. *Boletín del Centro Invest. Biol. Univ. Del Zulia*. 38(2): 120-139.
- CASAFE (Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes) (2011) *“Guía de Productos Fitosanitarios para la República Argentina”*. 15° Ed.
- Castañé, P. M.; Topalián, M. L.; Cordero, R. R. y Salibián, A. (2003) *Influencia de la especiación de los metales pesados en medio acuático como determinante de su toxicidad*. *Revista de Toxicología* 20: 13-18.
- Castelao, G. y Glur, G. (2012) *Trabajo de Campo 2012: Aspectos morfo-Biogeográficos en un sector de la cuenca del A° Corralito-Colastiné provincia de Santa Fe, República Argentina*. Apuntes de la cátedra Biogeografía. Facultad de Humanidades y Ciencias. Universidad Nacional del Litoral.

- CCME (Canadian Council of Ministers of the Environment) (1991) *Appendix IX—A protocol for the derivation of water quality guidelines for the protection of aquatic life (April 1991)*. En: *Canadian water quality guidelines, Canadian Council of Resource and Environment Ministers*. 1987. Canadian Council of Ministers of the Environment, 1999, Winnipeg.
- Chapman, G. A.; Ota, S. y Recht, F. (1980) *Effects of Water Hardness on the Toxicity of Metals to Daphnia magna* U.S. EPA, Corvallis, OR, p. 17. En: *U.S. Environmental Protection Agency*. 1985. Ambient Water Quality Criteria for Lead-1984. EPA 440/5-84-027. Washington. DC., p. 136.
- Christopher, S. V. y Bird, K. T. (1992) *The effects of herbicides on development of Myriophyllum spicatum L. cultured in vitro*. J. Environ Qual. 21:203-7.
- Cirujano, S. (1990) *Flora y vegetación de las lagunas y humedales de la provincia de Albacete*. Serie I. Ensayos históricos y científicos Vol. 52. Albacete: Instituto de Estudios Albacetenses de la Excmá Diputación de Albacete, CSIC, Confederación Española de Centros de Estudios Locales, p. 144.
- Cirujano, S., 1995. *Flora y vegetación de las lagunas y humedales de la provincia de Cuenca*. Madrid: Junta de Comunidades de Castilla-la Mancha, Real Jardín Botánico, CSIC.
- Coors, A.; Vanoverbeke, X.; De Bie, J. T. y De Meester, L. (2009) *Land use, genetic diversity and toxicant tolerance in natural populations of Daphnia magna*. Aquat. Toxicol., 95 (1):71–79.
- Cox, C. (2004) *Glyphosate*. J Pestic Reform 24: 10–15.
- Craig, A.; Hare, L.; Charest, P.M. y Tessier, A. (1998) *Effect of exposure regime on the internal distribution of cadmium in Chironomus staegeri larvae (Insecta, Diptera)*. Aquat. Toxicol., 41: 265–275.
- Dave, G. (1984) *Effects of copper on growth, reproduction, survival and haemoglobin in Daphnia magna*. Comparative Biochemistry and Physiology, 78(2): 439-443.
- Davies, P. E.; Cook, L. S. J. y Goenarso, D. (1994) *Sublethal responses to pesticides of several species of australian freshwater fish and crustaceans and rainbow trout*. Environ. Toxicol. Chem., 13: 1341-1354.
- De Lorenzo, M. E.; Taylor, L. A.; Lund, S. A.; Pennington, P. L.; Strozier, E. D. y Fulton, M. H. (2002) *Toxicity and Bioconcentration Potential of the Agricultural Pesticide Endosulfan in Phytoplankton and Zooplankton*. Archives of Environ. Contam. and Toxicol. 42 (2): 173-181.
- De Lorenzo, M. E.; Scott, G. I. y Ross, P. E. (2001) *Toxicity of pesticides to aquatic microorganisms: A review*. 20 (1): 84–98.
- De Noyelles, F.; Kettle, W. D. y Sinn, D. N. (1982) *The Responses of Plankton Communities in Experimental Ponds to Atrazine, the Most Heavily Used Pesticide in the United States*. Ecology, 63 (5): 1285-1293.
- De Samber, B.; Evens, R.; De Champhelaere, K.; Silversmit, G.; Masschaele, B.; Schoonjans, T.; Vekemans, B.; Janssen, C. R.; Van Hoorebeke, L.; Szalóki, I.; Vanhaecke, F.; Falkenberg, G. y Vincze, L. (2008) *A combination of synchrotron and laboratory X-ray techniques for studying tissue-specific trace level metal distributions in Daphnia magna*. J. Anal. At. Spectrom., 23: 829-839.
- Degraeve, G. M.; Cooney, J. D.; Marsh, B. H.; Pollock, T.L. y Reichenbach, N.G. (1992) *Variability in the performance of the 7-d Ceriodaphnia dubia survival and reproduction test: an intra and interlaboratory study*. Environ. Toxicol. Chem., 11: 851-858.
- Dente, M. V. y Martinez, S. (2010) *Atlas digital de Cuencas y Regiones Hídricas Superficiales de la República Argentina*.
- Dewey, S. L. (1986) *Effects of the herbicide atrazine on aquatic insect community structure and emergence*. Ecology, 67(1): 148-162.
- Diamond, J. M.; Koplisch, D. E.; McMahon, J. y Rost, R. (1997) *Evaluation of the Water-Effect Ratio Procedure for Metals in a Riverine System*. Environ. Toxicol. Chem., 16(3): 509-520.
- Díaz Baez, M. C.; Pica Granados, Y. y Ronco, A. (2004) *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de agua. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. Cap 2*. Ed: Castillo Morales, G. México: IMTA (Instituto Mexicano de Tecnología del Agua). Canadá: IDRC., p. 189.

- Dodson, S.I. y Frey D.G. (1991). *Cladocera and other Branchiopoda*. (Eds.: Thorp, J.H. Covich, A.P.) Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates, Academic Press, San Diego, pp. 723–786
- Domínguez-Cortinas, G.; Mejía-Saavedra, J.; Santos-Medrano, G. E. y Rico-Martínez, R. (2008) *Analysis of the toxicity of glyphosate and Faena® using the freshwater invertebrates Daphnia magna and Lecane quadridentata*. Toxicol. Environ. Chem., 90: 377-384.
- Donnadieu-Claraz, M.; Bonnehogne, M.; Dhieux, B.; Maubert, C.; Cheynet, M.; Paquet, F. y Gourmelon, P. (2007) *Chronic Exposure to Uranium Leads to Iron Accumulation in Rat Kidney*. Cells. Radiat. Res., 167: 454–464.
- Dussart, B. H. y Frutos, S. M. (1986) *Sur quelques Copépodes d'Argentine*. Revue d'Hydrobiologie Tropicale 19(3-4): 241-262.
- Elendt, B. P. y Bias, W. R. (1990) *Trace nutrient deficiency in daphnia magna cultured in standard medium for toxicity testing, effects of the optimization of culture conditions on life history parameters of D. magna*. Water Res., 24:1157–1167.
- Elmoor-Loureiro, L. M. A. (1998) *Branchiopoda fresh water*, p.15-41. En: *Catalogue of Crustacea of Brazil* (Ed.: Younf, P. S.) Museu Nacional, Rio de Janeiro, p.717.
- Enserink, L.; de la Haye, M. y Maas, A. (1993) *Reproductive strategy of Daphnia magna: implications for chronic toxicity tests*. Aquat. Toxicol., 25 (1-2): 111-123.
- EPA (Environmental Protection Agency) (1984) *Estimating concern levels for concentrations of chemical substances in the environment*. Environmental effects Branch, environmental Protection Agency, Washington DC, USA.
- EPA (Environmental Protection Agency) (1994) *Methods for the Determination of Metals in Environmental Samples - Supplement I - EPA/600/R-94-111 - T.D. Martin et. al. - Method 200.2 - Sample Preparation Procedure For Spectrochemical Determination Of Total Recoverable Elements. - J.T. Creed et. al - Method 200.9 , Revision 2.2 - Determination Of Trace Elements By Stabilized Temperature Graphite Furnace Atomic Absorption*. Cincinnati, Ohio. EEUU.
- EPA (Environmental Protection Agency) (1994) *Methods for the Determination of Metals in Environmental Samples - Supplement I - EPA/600/R-94-111 - T.D. Martin et. al. - Method 200.2 - Sample Preparation Procedure For Spectrochemical Determination Of Total Recoverable Elements. - J.T. Creed Mason y Jenkins (1995), et. al - Method 200.9 , Revision 2.2 - Determination Of Trace Elements By Stabilized Temperature Graphite Furnace Atomic Absorption*. Cincinnati, Ohio. EEUU.
- Epstein, E. y Grant, W. J. (1968) *Chlorinated insecticides in run-off water as affected by crop rotation*. Soil Soc. Am. Proc. 32: 423-426. En: IPCS (International Programme on Chemical Safety).1984. Environmental Health Criteria 40. Endosulfan. World Health Organization. Geneva.
- Escalante, A. H. (1982) *Contribución al conocimiento de las relaciones tróficas de peces de agua dulce del área platense. I. Astyanax eigenmanniorum (Osteichthyes Tetragonopteridae)*. Limnobiós 2 (5): 311-322.
- Ewell, W.; Gorsuch, J.; Kringle, R.; Robillard, K. y Spiegel, R. (1986) *Simultaneous evaluation of the acute effects of chemicals on seven aquatic species*. Environ. Toxicol. Chem., 5: 831-840.
- Fargasová, A. (1994) *Comparative toxicity of five metals on various biological subjects*. Bull. of Environ. Contam. and Toxicol. 53: 317-324.
- Ferrari, B. y Ferard, J. F. (1996) *Effects of nutritional renewal frequency on survival and reproduction of Ceriodaphnia dubia*. Environ. Toxicol. Chem., 15:765–770.
- Ferreira, L. S.; Santos Rodrigues, M.; Monteiro de Carvalho, J. C.; Lodi, A.; Finocchio, E.; Perego, P. y Converti, A. (2011) *Adsorption of Ni²⁺, Zr²⁺ and Pb²⁺ onto dry biomass of Arthrospira (Spirulina) platensis and Chlorella vulgaris. I. Single metal systems*. Chem. Engineering J., 173: 326–333.
- Finney, D. J. (1971) *Probit Analysis*. 3th Ed. Cambridge Univ. Press, Londres, pp. 234.
- Font, R.; Gomis, V.; Fernandez, J. y Sabater, M. C. (1998) *Physico-chemical characterization and leaching of tannery wastes*. Waste Manag. Res. 16 (2): 139-149.

- Forbes, V. E. y Calow, P. (1996) *Costs of living with contaminants: implications for assessing low-level exposures*. Belle Newsletter (Publication of Northeast Regional Environmental Public Health Center) MA, 4: 1-8.
- Forbes, V. E. y Forbes, T. L. (1994) *Ecotoxicology in Theory and Practice*. Chapman and Hall, London.
- Forney, D. R y Davis, D. E. (1981) *Effects of low concentrations of herbicides on submersed aquatic plants*. Weed. Sci., 29: 677-685. En: Solomon, K.R., D.B. Baker, R.P. Richards, K.R. Dixon, S.J. Klaine, T.W. La Point, R.J. Kendall, C.P. Weisskopf, J.M. Giddings II and J.P. Giesy. 1996. *Ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters*. Environ.Toxicol.Chem., 15(1): 31-76.
- Freitas, E. C. y Rocha O. (2011) *Acute Toxicity Tests with the Tropical Cladoceran Pseudosida ramosa: The Importance of Using Native Species as Test Organisms*. Archives of Environ. Contam. and Toxicol. 60(2): 241-249.
- Gagneten A.M. (2002) Respuesta de una comunidad zooplanctónica de agua dulce a la aplicación de cromo en clausuras experimentales. *Interciencia* 27 (10): 563-570.
- Gagneten, A. M. y Ceresoli, N. (2004) *Efectos del efluente de curtiembre sobre la abundancia y riqueza de especies del zooplancton en el Arroyo Las Prusianas (Santa Fe, Argentina)*. *Interciencia* 29 (12): 702-708.
- Gagneten, A. M. y Paggi, J. C. (2009) *Effects of heavy metal contamination (Cr, Cu, Pb, Cd) and eutrophication on zooplankton in the lower basin of the Salado River (Argentina)*. *Water Air Soil Pollut.* 204: 133-138.
- Gagneten, A. M. y Vila, I. (2001) *Effects of Cu²⁺ and pH on the Fitness of Ceriodaphnia dubia (Richard 1894) (Crustacea, Cladocera) in Microcosm Experiments*. *Environ. Toxicol.* 16: 428-438.
- Gagneten, A. M.; Gervasio, S. y Paggi, J. C. (2007) *Heavy metal pollution and eutrophication in the lower Salado River basin (Argentine Republic)*. *Water Air Soil Pollut.* 178, 335-349.
- Gallo, M.; Trento, A. y Alvarez, A. (2006) *Dissolved and particulate heavy metals in the Salado River (Santa Fe, Argentina)*. *Water Air Soil Pollut.* 174: 67-384.
- Gaviria, S.; Aranguren, N. y Realpe, E. (2010) *Branchiopods (Arthropoda, Crustacea) of Colombia: Checklist with biogeographical and autoecological notes of selected species*, p. 4-5. En: Biology Center of the Academy of Sciences of the Czech Republic, Cesce Budejovice y Crop Research Institute, Prague (Eds.). *International Conference on Invertebrate Reproduction and Development in the Age of Genetics Modifications (ICIRD)*. Praga. 5 p.
- Geller, W. y Müller, H. (1981) *The filtration apparatus of Cladocera: Filter mesh-sizes and their implications on food selectivity*. *Oecologia.* 49: 316-321.
- Gerhardt, A. (1994) *Short term toxicity of iron (Fe) and lead (Pb) to the mayfly Leptophlebia marginata (L.) (Insecta) in relation to freshwater acidification*. *Hydrobiologia*, 284: 157-168.
- Giesy, J. P.; Dobson, S. y Solomon, K. R. (2000) *Ecotoxicological risk assessment for Roundup-herbicide*. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 8, 269-278.
- Giunta, R.; Zalesky, M.; Sona, G. (2005) *Cambios registrados en el sector agropecuario santafesino entre 1988 y 2002: análisis de las variables más significativas*. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Recursos Naturales, Ministerio de la producción, Gobierno de la Provincia de Santa Fe.
- González-Barreiro, O.; Rioboo, C.; Herrero, C. y Cid, A. (2006) *Removal of triazine herbicides from freshwater systems using photosynthetic microorganisms*. *Environ. Pollut.* 144 (1): 266-271.
- GraphPad InStat (2004). GraphPad Software, versión 3.06. San Diego, California, USA.
- Graymore, M., Stagnitti, F. y Allinson, G. (2001) *Impacts of atrazine in aquatic ecosystems*. *Environ. Int.* 26, 483-495.
- Guillard, R. L. (1975) *Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates*. En: *Culture of marine invertebrate animals* (Eds.: Smith, W. L. y Chanley, M. H.) Plenum Press, New York, pp. 29-60.
- Gutiérrez, M. F. y Gagneten, A. M. (2011) *Efecto de los metales sobre microcrustáceos de agua dulce. Avances metodológicos y potencialidad de cladóceros*. *Rev. Perú Biol.* 18(3): 389 - 396.

- Gutiérrez, M. F.; Gagneten, A. M. y Paggi, J. C. (2010) *Copper and chromium alter life cycle variables and the equiproportional development of the freshwater copepod Notodiaptomus conifer (SARS)*. Water Air Soil Pollut. 213: 275–286.
- Gutiérrez, M. F.; Gagneten, A. M. y Paggi, J. C. (2012) *Exposure to sublethal chromium and endosulfan alter the diel vertical migration (DVM) in freshwater zooplankton crustaceans*. Ecotoxicol. 21 (1): 37-47.
- Hall J. C; van Deynze; T. D.; Struger, J. y Chan, C. H. (1993) *Enzyme immunoassay based survey of precipitation and surface water for the presence of atrazine, metolachlor and 2,4-D*. J. Environ. Sci. Health, Part B. 28 (5): 577-98.
- Hamala, J. A. y Kollig, H.P. (1985) *The effects of atrazine on periphyton communities in controlled laboratory ecosystems*. Chemosphere 14: 1391-1408.
- Hamilton, P. B.; Jackson, G. S.; Kaushik, N. K.; Solomon, K. R. y Stephenson, G. L. (1988) *The impact of two applications of atrazine on the plankton communities of in situ enclosures*. Aquat. Toxicol., 13 (2):123–139.
- Han, X.; Wong, Y. S. y Fung Yee Tam, N. *Surface complexation mechanism and modeling in Cr(III) biosorption by a microalgal isolate, Chlorella miniata*. J. of Coll. and Interf. Sci. 303 (2006) 365–371.
- Hanazato, T. (1998) *Response of zooplankton community to insecticide application in experimental ponds: a review and the implications of the effects of chemical on the structure and functioning of freshwater communities*. Environ. Pollut., 101: 361-373.
- Hanazato, T. (2001) *Pesticide effects on freshwater zooplankton: an ecological perspective*. Environ. Pollut., 112: 1-10.
- Hashim, M. A.; Soumyadeep Mukhopadhyay, J.; Narayan, S. y Bhaskar, S. (2011) *Remediation technologies for heavy metal contaminated groundwater*. J. Environ. Mngmt., 92: 2355-2388.
- Hickey, C. (1989) *Sensitivity of four New Zealand cladoceran species and Daphnia magna to aquatic toxicants*. New Zealand J. Marine Fresh. Res., 23: 131-137. En: Pawlisz, A.V.; Kent, R.A.; Schneider, U. A. y Jefferson, C. (1997) *Canadian Water Quality Guidelines for Chromium*. Environ. Toxicol. Water Qual., 12: 185-193.
- Hiroyuki Mano; Yutaka Ogamino; Masaki Sakamoto y Yoshinari Tanaka (2011) *Acute toxic impacts of three heavy metals (copper, zinc, and cadmium) on Diaphanosoma brachyurum (Cladocera: Sididae)*. Limnology, 12(2): 193-196.
- Infante, A. (1980) *Los cladóceros del Lago de Valencia*. Act. Cient. Venezolana, 31: 593-603.
- Infante, A. (1988). *El plancton de las aguas continentales*. Monografía Editorial Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos Washington, D.C. 130 p.
- InfoStat, (2004) Grupo Infostat, FCA. Universidad Nacional de Córdoba. 1a eds. Editorial Brujas, Argentina.
- Jose de Paggi, S. (1995). *Rotifera*. En: *Ecosistemas de aguas continentales. Metodología para su estudio*. (Eds.: Lopretto, E. y Tell, G.) Tomo III: 909-951. Ediciones Sur, La Plata, Argentina.
- José de Paggi, S. y Devercelli, M. (2011) *Land Use and Basin Characteristics Determine the Composition and Abundance of the Microzooplankton*. Water Air Soil Pollut. 218: 93-108. DOI 10.1007/s11270-010-0626-3.
- Jurgensen, T. A. y Hoagland, K.D. (1990) *Effects of short term pulses of atrazine on attached communities in a small stream*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 19: 617-623.
- Kenaga, E. (1982) *Predictability of chronic toxicity from acute toxicity of chemicals in fish and aquatic invertebrates*. Environ. Toxicol. Chem., 1:347–358.
- Kent, R.A. y Currie, D. (1995) *Predicting algal sensitivity to a pesticide stress*. Environ Toxicol Chem 14: 983–991.
- Khargarot, B.S. y Ray, P.K. (1989) *Investigation of correlation between physicochemical properties of metals and their toxicity to the water flea Daphnia magna Straus*. Ecotoxicol. Environ. Saf., 18(2): 109-120.
- Kluttgen, B.; Kuntz, N. y Ratte, H. T. (1996) *Combined effects of 3,4-dichloroaniune and food concentration on life-table data of two related cladocerans, Daphnia Magna and Ceriodaphnia Quadrangula*. Chemosphere, 32(10): 2015-2028.

- Knauf, W. y Schulze, E. F. (1973) *New findings on the toxicity of endosulfan and its metabolites to aquatic organisms*. Fac. Landbouwwetensch. Rijksuniv. Gent. 38 (3): 717-732.
- Koivisto, S. (1995) *Is Daphnia an ecologically representative zooplankton species in toxicity tests?* *Environmental Pollution*, 90(2): 263-267.
- Koivisto, S.; Ketola, M. y Walls, M. (1992) *Comparison of five cladoceran species in short- and long-term copper exposure*. *Hydrobiol.* 348: 125-136.
- Kosinski, R. J. (1984) *The effect of terrestrial herbicides on the community structure of stream periphyton*. *Environ. Pollut. Ser.* 36: 165-189. En: CCME (Canadian Council of Ministers of the Environment). 1999. Canadian Environmental Quality Guidelines.
- Koste, W. y Shiel, R. J. (1989) *Rotifera from Australian Inland waters IV. Colurellidae (rotifera: monogononta)*. *Transactions of the Royal Society of Aust.*, 113 (3) 119-143.
- Koste, W. y Shiel, R. J. (1990). *Rotifera from Australian Inland waters V. Lecanidae (Rotifera: Monogononta)*. *Rotifera Transactions of the Royal Society of Aust.*, 114 (1) 1-36.
- Kumar, M. y Philip, L. (2006) *Bioremediation of endosulfan contaminated soil and water— Optimization of operating conditions in laboratory scale reactors*. *Journal of Hazardous Materials B136*: 354–364.
- Kungolos, A. y Aoyama, I. (1993) *Interaction effect, food effect, and bioaccumulation of cadmium and chromium for the system Daphnia magna- Chlorella ellipsoidea*. *Environmental Toxicology and Water Quality: An Internat. J.* 8: 351-369.
- Lakshminarayana, J. S. S.; O'Neill, H. J.; Jonnavithula, S. D.; Leger, D. A. y Milburn, P. H. (1992) *Impact of atrazine-bearing agricultural tile drainage discharge on planktonic drift of a natural stream*. *Environ. Pollut.* 76: 201–210.
- Larsen, D. P.; De Noyelles, F. J.; Stay, F. y Shiroyama, T. (1986) *Comparisons of single-species microcosmos and experimental pond responses to atrazine exposure*. *Environ. Toxicol. Chem.* 5: 179-190.
- LeBlanc, G.A. (1982) *Laboratory investigation into the development of resistance of Daphnia magna to environmental pollutants*. *Environ. Pollut.* 27: 309-322.
- Lesmana, S. O.; Febriana, N.; Soetaredjo, F. E.; Sunarso, J. y Ismadji, S. (2009) *Studies on potential applications of biomass for the separation of heavy metals from water and wastewater*. *Biochem. Engineering J.* 44: 19–41.
- Liang, Y.; Sarkany, N. y Cui, I. (2009) *Biomass and lipid productivities of Chlorella vulgaris under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions*. *Biotechnol. Lett.* 31:1043–1049.
- Lodi, A.; Finocchio, E.; Converti, A. y Solisio, C. (2010) *Removal of bivalent and trivalent ions by Spirulina platensis biomass: batch experiments and biosorbent characterization*. *Int. J. Environ. Technol. Management.* 12: 202–213.
- Loeppky, C. y Tweedy, B. C. (1969) *Effects of selected herbicides upon growth of soil algae*. *Weed Sci.* 17: 110-113. En: Solomon, K. R.; Baker, D. B. ; Richards, R. P.; Dixon, K. R.; Klaine, S. J.; La Point, T. W.; Kendall, R. J.; Weisskopf, C. P.; Giddings, J. M. y Giesy, J. P. (1996) *Ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters*. *Environ. Toxicol. Chem.* 15(1): 31-76.
- Lopes, I.; Moreira-Santos, M.; Rendo-von Osten, J.; Baird, D. J.; Soares, A. M. y Ribeiro, R. (2011) *Suitability of five cladoceran species from Mexico for in situ experimentation*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74: 1 111–116.
- Lopretto, E. y Tell, G. (1995) *Ecosistemas de aguas continentales. Metodología para su estudio*. Tomo I. Ediciones Sur, La Plata, Argentina.
- Luoma, S. N. y Rainbow, P. (2005) *Why is metal bioaccumulation so variable? Biodynamics as a unifying concept*. *Environ. Sc. Tech.* 38 (7):1921- 1931.
- Maguire, R. J. y Tkacz, R. J. (1993) *Occurrence of pesticides in the Yamaska River*. Québec Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 25: 220-226
- Mallick, N. (2004) *Copper-induced oxidative stress in the chlorophycean microalga Chlorella vulgaris: response of the antioxidant system*. *Plant Physiol.* 161: 591–597.
- Manzi, R. y Gallardo, M. (1970) *Geografía de Santa Fe*. Spadoni S.A. Mendoza, Argentina, p. 192.
- Margalef, R. (1983). *Limnología*. Omega, Barcelona, España, p 1010.

- Markich, S.J. y Jeffree, R.A. (1994) *Absorption of divalent trace metals as analogues of calcium by Australian freshwater bivalves: an explanation of how water hardness reduces metal toxicity*. *Aquat.Toxicol.* 29: 257-290.
- Mason, A.Z. y Jenkins, K.D. (1995). *Metal detoxication in aquatic organisms*. En: *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*, vol. 3 (Eds.: A. Tessier, A. y Turner, D.R.) Chichester: Wiley, p. 479-608.
- Masters, J. A.; Lewis M.A. y Davidson, D.H. (1991) *Validation of a Four-Day Ceriodaphnia Toxicity Test and Statistical Considerations in Data Analysis*. *Environ. Toxicol. Chem.* 10: 47-55.
- Mayol, C. y Hammerly, J. (2012) *Efluentes cloacales e industriales. Análisis, diseño de tratamientos y gestión*. Primera ed. Centro de ed. técnicas colegio de ing. especialistas de la provincia de Santa Fe. 456 p. ISBN 978-987-20788-3-6.
- Mills, W. B.; Porcella, D. B.; Unga, M. J.; Gherini, S. A.; Summers, K. V.; Lingfung Mok, Rupp, G. L. ; Bowie, G. L. y Haith D. L. (1985) *Water Quality Assessment: A Screening Procedure for Toxic and Conventional Pollutants in Surface and Ground Water*. EPA/600/6-85/002 a. U.S. Environmental Protection Agency.
- Min, G.; Wang, S.; Zhu, H.; Fang, G.; Zhang, Y. (2008) *Multi-walled carbon nanotubes as solid-phase extraction adsorbents for determination of atrazine and its principal metabolites in water and soil samples by gas chromatography-mass spectrometry*. *Science of the Total Environ.* 396, 79-85.
- Miretzky, P. y Fernández Cirelli, A. (2010) *Cr (VI) and Cr(III) removal from aqueous solution by raw and modified lignocellulosic materials: A review*. *Journal of Hazardous Materials.* 180: 1-19
- Mohapatra, P. K. y Mohanty, R. C. (1992) *Contamination and Toxicology Growth Pattern Changes of Chlorella vulgaris and Anabaena doliolum Due to Toxicity of Dimethoate and Endosulfan*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 49: 576-581.
- Montes, C. y Martino, P. (1987) *Las lagunas salinas españolas*. En Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales: *Bases científicas para la protección de los humedales en España*, p. 95-145
- Munzinger, A. y Monicelli, F. (1992) *Heavy metal co-tolerance in a chromium tolerant strain of Daphnia magna*. *Aquat. Toxicol.* 23: 203.
- Nacorda, J. O.; Martinez-Goss, M. R.; Torreta, N. K. y Merca, F. E. (2007) *Metal resistance and removal by two strains of the green alga, Chlorella vulgaris Beijerinck, isolated from Laguna de Bay, Philippines*. *J. Appl. Phycol.* 19: 701-710.
- Nečas, J. (1969) *Influence of light on the autospore number of some Chlorococcal algae*. *Biologia Plantarum.* 11:6.
- Newman, M. C. y Unger, M. A. (2003) *Fundamentals of Ecotoxicology*. Lewis Publishers, CRC Press, Florida, Estados Unidos, p. 458.
- NRCC (National Research Council of Canada). (1978). *Effects on arsenic in the canadian environment*. En: *Handbook of chemical risk assessment* (Eds.: Eisler, R.) Lewis Publishers, Boca Raton, Florida. Estados Unidos, p. 1501-1566.
- OECD (1981) Test Guideline 452. Chronic Toxicity Studies. In: OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Organization for Economic Cooperation & Development, Paris.
- OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) (1984) *Guideine for Testing of Chemicals. Alga, Growth Inhibition Test*.
- Oeser, H.; Gorbach, S.G. y Knauf, W. (1971) *Endosulfan and the environment*. Presented at the Workshop on Phytopathology (Giornate Fitopatologie), Udine, Italy, May 1971.
- Oliveros, O. (1980) *Campaña limnológica "Keratella I" en el Río Paraná Medio: Aspectos tróficos de peces de ambientes leníticos*. *Ecología.* 4:115-126.
- Orozco Barrenetxea, C.; Pérez Serrano, A.; González Delgado, M.N.; Rodríguez Vidal, F.J. y Alfayate Blanco, J.M. (2005) *Contaminación Ambiental. Una visión desde la química*. Thomson, Madrid, p: 682.
- Oswald, W.J. (1988) *Microalgae and wastewater treatment*. En: *Micro-Algal Biotechnology* (Eds.: Borowitzka, M.A. and Borowitzka, L.J.). Cambridge University Press. Cambridge, Inglaterra, p. 357-394.

- Paggi, J.C. (1973). *Acerca de algunas especies de la familia Moinidae (Crustacea, Cladocera) de la República Argentina*. Physis B 32 (85): 269 - 277.
- Paggi, J.C. (1995). *Cladocera*. En: *Ecosistemas de aguas continentales. Metodología para su estudio* (Eds.: Lopretto, E y Tell, G.) (eds). Ed. Sur, La Plata, Argentina, p. 909-951.
- Paggi, J.C. (1998) *Cladocera (Anomopoda y Ctenopoda)*. En: *Biodiversidad de Artrópodos Argentinos, Una perspectiva biotaxo-nómica*. (Eds.: Morrone, J.J. y Coscarón, S.) La Plata, Argentina, p. 507-518.
- Palma, P.; Palma, V.L.; Matos, C.; Fernández, R.M.; Bohn, A.; Soares, A.M. y Barbosa I.R. (2009) *Effects of atrazine and endosulfan sulfate on the ecdysteroid system of Daphnia magna*. Chemosphere. 74: 676-681.
- Panda, S.K. y Parta, H.K (1997) *Physiology of chromium toxicity in plants—a review*. Plant Physiol. Biochem. 24: 10–17.
- Pastorino, L. (2009). *Derecho Agrario Argentino*. (Eds.: Abeledo Perrot) Buenos Aires, Argentina, p. 680. ISBN: 9789502019406.
- Pearse, A. S. (1915) *An account of the Crustacea collected by the Walker Expedition to Santa Marta Colombia*. Proc. U.S. National Mus. Estados Unidos, p. 530-556.
- Pennak, R.W. (1978) *Fresh-water Invertebrates of the United States. Chapter 15 Cladoceros*. The Ronald Press Company, New York, Estados Unidos, p. 350-387.
- Pennak, R.W. (1989). *Freshwater Invertebrates of the United States*. (Eds.: J. Wiley Sons, P.) Nueva York, Estados Unidos, p. 625.
- Perez-Rama, M.; Alonso, J.; Lopez, C. y Vaamonde, E. (2002) *Cadmium removal by living cells of marine microalgae Tetraselmis suecica*. Biores. Technol. J. 84: 265–270.
- Persoone, G.; Van del Vel, A.; Van Steertegem, M. y De Nayer, B. (1989) *Predictive value of laboratory tests with aquatic invertebrates: influences of experimental conditions*. Aquat. Toxicol. 14: 149-166.
- Peruzzo, P.; Porta, A. y Ronco, A. (2008) *Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina*. Environ. Pollut. 156: 61-66.
- Piotrowska-Niczyporuk, A.; Bajguz, A.; Zambrzycka, E. y Godlewska-Zylkiewicz, B. (2012) *Phytohormones as regulators of heavy metal biosorption and toxicity in green alga Chlorella vulgaris (Chlorophyceae)*. Plant. Physiol. Biochem. 52: 52-65.
- Portal de noticias del Gobierno de la provincia de Santa Fe: <http://www.santafe.gov.ar/>
- Qian, H.; Li, J.; Sun, L.; Chen, W.; Sheng, G. D.; Liu, W. y Fu, Z. (2009) *Combined effect of copper and cadmium on Chlorella vulgaris growth and photosynthesis-related gene transcription*. Aquat. Toxicol. 94: 56–61.
- Rabier, J.; Laffont-Schwob, I.; Notonier, R.; Fogliani, B. y Bouraïma-Madjèbi, S. (2008). *Anatomical element localization by EDXS in Grevillea exul var. exul under nickel stress*. Environ. Pollut. 156: 1156-63.
- Rai, V.; Vajpayee, P.; Singh, S.N.; Mehrotra, S. (2004) *Effect of Cr accumulation on photosynthetic pigments, oxidative stress defense system, nitrate reduction, praline level and eugenol content of Ocimum tenuiflorum L*. Plant Sci. 167: 1159–1169.
- Raipulis, J.; Toma, M. M. y Balode, M. (2009) *Toxicity and genotoxicity testing of roundup*. Proc Latvian Ac Sci. 63: 29–32.
- Rand, G. M. y Petrocelli, S. R. (1985) *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. (Eds.: Rand, G.M. y Petrocelli, S.R.) Hemisphere Publishing Corporation, Washington, Estados Unidos, p. 1-29.
- Rao, N. y Lal, R. (1987) *Uptake and metabolism of insecticides by blue-green algae Anabaena and Aulosira fertilissima*. Microbiol Lett. 36:143–147.
- Regaldo, L.; Gagneten, A. M. y Troiani, H. (2009) *Accumulation of Chromium and interaction with other elements in Chlorella sp. (Cloroficeae) and Daphnia magna (Crustacea, Cladocera)*. J. Environ. Biol. 30: 213-216.
- Regaldo, L.; Gervasio S.; Gagneten, A. M. y Troiani, H. (2013). *Bioaccumulation and Toxicity of Copper and Lead in Chlorella vulgaris*. J. Algal Biomass Utln. 4: 59-66.
- Reid J. W. (1985) *Chave de identificação e lista de referências bibliográficas para as espécies continentais sulamericanas de vida livre da ordem Cyclopoida (Crustacea, Copepoda)*. Bolm. Zool. 9: 17-143.

- Repetto M. (1995) Toxicología avanzada. Madrid, España 621 p.
- Rey J. y E. Vásquez. (1986) *Cladocères de quelques corps d'eau du bassin moyen de Orénoque (Vénézuéla)*. *Annls Limnol.* 22: 137-168.
- Reynolds, C. S. (1984) *The ecology of Freshwater Phytoplankton*. Cambridge University Press, p.384.
- Richmond, A. (1986) *Handbook of microalgal mass culture* 1986. CRC, Boca Raton, pp 285–330
- Richmond, A. (2000) *Microalgal biotechnology at the turn of the millennium: A personal view*. *J. Appl. Phycol.* 12: 441–451
- Ringuelet, R. A. (1958). *Los crustáceos copépodos de las aguas continentales en la República Argentina. Sinópsis sistemática. Contribuciones Científicas. Serie Zoología, 1(2)*. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Buenos Aires. 126 pp.
- Rodgher, S.; Gaeta Espíndola, E. L. y Lombardi, A. T. (2010) *Suitability of Daphnia similis as an alternative organism in ecotoxicological tests: implications for metal toxicity*. *Ecotoxicol.* 19: 1027-1033.
- Romero, D. M.; Ríos de Molina, M. C. y Juárez, A. B. (2011) *Oxidative stress induced by a commercial glyphosate formulation in a tolerant strain of Chlorella kessleri*. *Ecotoxicol Environ Safe.* 74: 741-747.
- Rose, R. L.; Hodgson, E. y Roe, R. M. (1999) *Pesticides*. En: *Toxicology* (Eds.: Marquardt, H.; Schafer, S.G.; McClellan, R. y Welsch, F.) Academic press, Nueva York, Estados Unidos, p. 1330.
- Rossi, L. M. (1992) *Evolución morfológica del aparato digestivo de postlarvas y prejuveniles de Prochilodus lineatus (Val., 1847) (Pisces, Curimatidae) y su relación con la dieta*. *Revista Hydrobiologia Tropical.* 25:159–167.
- Rossi, L. M. (2001) *Ontogenetic diet shifts in a neotropical catfish, Sorubim lima (Schneider) from the River Paraná system*. *Fish Manag. Ecol.* 8:141–152.
- Ruiz R. y Bahamonde N. (1989) *Cladóceros y copépodos límnicos en Chile y su distribución geográfica. Lista sistemática. Publicación N° 45. Museo Nacional de Historia Natural. Santiago, Chile. 48 p.*
- Sacan, M. T.; Oztay, F. y Bolkent, S. (2007) *Exposure of Dunaliella tertiolecta to Lead and Aluminum: Toxicity and Effects on Ultrastructure*. *Biol. Trace Elem. Res.* 120: 264-72.
- Sáenz, M. E. y Di Marzio, W. (2009) *Ecotoxicidad del herbicida Glifosato sobre cuatro algas clorófitas dulceacuícolas*. *Limnetica* 28: 149-158.
- Sáenz, M. E.; Di Marzio W. y Alberdi, J.L. (2012) *Assessment of Cyfluthrin commercial formulation on growth, photosynthesis and catalase activity of green algae*. *Pest Biochem Physiol.* 114: 50-57
- Sager, R. y Granik, S. (1953) *Nutritional studies with Chlamydomonas reinhardtii*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 56: 831-838.
- Sakamoto, Masaki; Ogamino, Yutaka; Tanaka, Yoshinari. (2010) *Leptodora kindtii: a cladoceran species highly sensitive to toxic chemicals*. *Limnology.* 11: 193 - 196.
- Schubauer-Berigan, M. K.; Dierkes, J. R.; Monson, P. D. y Ankley, G. T. (1993) *pH-Dependent toxicity of Cd, Cu, Ni, Pb and Zn to Ceriodaphnia dubia, Pimephales promelas, Hyalella azteca and Lumbriculus variegatus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 12: 1261–1266.
- Schultz F. (1977) *Fine structure of the ephippium of daphnia pulex (Crustacea Cladocera)*. *Trans Am. Microsc.Soc.* 96: 313-321
- Seco Gordillo, J. I.; Fernández Pereira, C. y Vale Parapar, J.F. (1998) *Acute ecotoxicity evaluation of heavy metals with Daphnia magna Straus*. *Ecotoxicol. Environ.* 1: 3-12.
- Seco Gordillo, J. I.; Vale Parapar, J. F. y Fernández Pereira, F. (1994) *Determinación de la ecotoxicidad de residuos industriales por inhibición de la movilidad de Daphnia magna Straus. Contribución a la sistemática del ensayo. III Congreso Internacional de Química de la ANQUE. Tenerife, España, 1: 253-261.*
- Semaan, M. (1999) *Population variability in the response of Moinodaphnia macleayi to uranium and cadmium*. BAppSc (Hons) Thesis, Royal Melbourne Institute of Technology, Melbourne, Victoria, Australia.

- Semaan, M.; Holdway, D. A y Van Dam, R. A. (2001) *Comparative sensitivity of three populations of the cladoceran Moinodaphniamacleayi to acute and chronic uranium exposure*. Environ.Toxicol. 16: 365-376.
- SENASA (Servicio Nacional de Seguridad y Calidad Agropecuaria) (1998) Límites máximos de residuos de plaguicidas. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación.
- Severeyn, H. y Rodríguez, G. (2000) *La fauna estuarina: Invertebrados*. En: *El Sistema del Lago de Maracaibo* (Eds.: Rodríguez, G.). Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Caracas, Venezuela, p. 264.
- Siao P.C.; Li, G. C.; Engle, H. L.; Ilao L. V. y Trinidad L. C. (2007) *Biosorption of Cu(II) ions from synthetic and actual wastewater using three algal species*. J. Appl Phycol 19:733–743.
- Singh S. K.; Bansal, A.; Jha M. K. y Dey, A. (2012). *An integrated approach to remove Cr(VI) using immobilized Chlorella minutissima grown in nutrient rich sewage wastewater*. Bioresource Technology. 104: 257–265
- Sloof, W.; Haring, B. J. A.; Hesse, J. M.; Janus J. A. y Thomas. R. (1990) *Integrated Criteria Document Arsenic*. Report N° 710401004. National Institute of Public Health and Environmental Protection. Bilthoven. The Netherlands.
- Sokal, R. R. y Rohlf, F. J. (1969) *Biometría. Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica*, Madrid, España, p. 852.
- Solomon, K. R.; D. B. Baker, R. P.; Richards, K. R.; Dixon, S. J.; Klaine, T. W.; La Point, R. J. Kendall, C. P.; Weisskopf, J. M.; Giddings I. I. y Giesy, J. P. (1996) *Ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters*. Environ. Toxicol. Chem.15: 31-76.
- Spehar R. L. y Fiandt J. T. (1986) *Acute and chronic effects on water quality criteria-based metal mixtures on three aquatic species*. Environ. Toxicol. Chem. 5: 917-931.
- Spoljaric, D.; Cipak, A.; Horvatic, J.; Andrisic, L.; Waeg, G.; Zarkovic, N. Y Jaganjac, M. (2011) *Endogenous 4-hydroxy-2-nonenal in microalga Chlorella kessleri acts as a bioactive indicator of pollution with common herbicides and growth regulating factor of hormesis*. Aquat Toxicol. 105: 552– 558.
- Srivastava, S.; Mishra, S.; Tripathi, R.; Dwivedi, S. y Gupta, D. (2006). *Copper-induced oxidative stress and responses of antioxidants and phytochelatins in Hydrilla verticillata (L.f.) Royle*. Aquat. Toxicol. 80: 405–415.
- Stouthart, A. J.; Spanings, F. A. T.; Locks, R. A. C. y Wendelaar Bonga, S. E. (1994) *Effects of low water pH on lead toxicity to early life stages of the common carp (Cyprinus carpio)*. Aquat Toxicol. 30: 137-151.
- Stratton, G. W. (1984) *Effects of the herbicide Atrazine and its degradation products alone and in combination, on phototropic microorganisms*. Arch. Env. Contam. Tox. 13:35 42.
- Subsecretaría de Medio Ambiente y Ecología (1998). Inf. N° 111/98 ACCH. Ref.: Estudio de metales pesados en la Cuenca del Río Salado Inferior. p. 23.
- Subsecretaría de recursos hídricos de la República Argentina. (2010) Atlas digital de Cuencas y Regiones Hídricas Superficiales de la República Argentina.
- Subsecretaría Nacional de Recursos Hídricos (2003) a. Desarrollo de Niveles Guía Nacionales de Calidad de Agua ambiente correspondientes a Cromo. Argentina.
- Subsecretaría Nacional de Recursos Hídricos (2003) b. Desarrollo de Niveles Guía Nacionales de Calidad de Agua ambiente correspondientes a Atrazina. Argentina.
- Subsecretaría Nacional de Recursos Hídricos (2004) a. Desarrollo de Niveles Guía Nacionales de Calidad de Agua ambiente correspondiente a Arsénico. Argentina.
- Subsecretaría Nacional de Recursos Hídricos (2004) b. Desarrollo de Niveles Guía Nacionales de Calidad de Agua ambiente correspondiente a Endosulfán. Argentina.
- Subsecretaría Nacional de Recursos Hídricos (2005) a. Desarrollo de Niveles Guía Nacionales de Calidad de Agua ambiente correspondiente a Plomo. Argentina.
- Subsecretaría Nacional de Recursos Hídricos (2005) b. Desarrollo de Niveles Guía Nacionales de Calidad de Agua ambiente correspondiente a Cobre. Argentina.
- Sullivan, B. K.; Buskey, E.; Miller, D. C. y Ritacco, P. J. (1983) *Effects of copper and cadmium on growth, swimming and predator avoidance in Eurytemora affinis (Copepoda)*. Marine Biology. 77: 299-306.

- Sunda, W. G.; Teste P. A. y Huntsman S. A. (1987) *Effects of cupric and zinc ion activities on the survival and reproduction of marine copepods*. Marine Biology. 94: 203-210.
- Suñe, N.; Sánchez, G.; Caffaratti, S. y Maine, M. A. (2007) *Cadmium and chromium removal kinetics from solution by two aquatic macrophytes*. Environ. Pollut. 145, 467- 473.
- Sung-Eun Lee, Jong-Soo Kim, Ivan R. Kennedy, Jong-Woo Park , Gi-Seok Kwon ,Sung-Cheol Koh, y Jang-Eok Kim. (2003) *Biotransformation of an Organochlorine Insecticide, Endosulfan, by Anabaena Species*. _J. Agric. Food Chem. 51:1336–1340.
- Sylva, R.N. (1975) *The environmental chemistry of copper (II) in aquatic systems*. Water Res.. 10: 789-792.
- Takahashi, I. T.; Cowgill, U. M. y Murphy, P. G. (1987) *Comparison of ethanol toxicity to Daphnia magna and Ceriodaphnia dubia tested at two different temperatures: static acute toxicity test results*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 39, 229.
- Tang, J.; Hoagland, K.D. y Siegfried, B.D. (1998) *Uptake and bioconcentration of atrazine by selected freshwater algae*. Environ. Toxicol. Chem. 17: 1085–1090.
- Tortorelli, M. C. y Hernández, D. A. (1995). *Calidad de agua de un ambiente acuático sometido a efluentes contaminantes*. En: *Ecosistemas de aguas continentales. Metodologías para su estudio*. Tomo 1. (Ed: Lopretto, E. y Tell, G. Sur. 377 p.
- Tsui, M.T. y Chu, L.M. (2003) *Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effect of environmental factors*. Chemosphere 52:1189–1197.
- United States Department of Agriculture (USDA) (2013) *Commodity and Country Analysis*. Line: <http://www.fas.usda.gov/psdonline/>
- United States Environmental Protection Agency (USEPA) (1980) *Ambient water quality criteria for endosulfan*. Office of Water Regulations and Standards. Washington, D.C, Estados Unidos.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA) (1991) a. *Method 200.3. Sample preparation procedure for spectrochemical determination of total recoverable elements in biological tissues*. Environmental Protection Agency, Washington, D.C, Estados Unidos.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA) (1991) b. *Method 200.2. Sample preparation procedure for spectrochemical determination of total recoverable elements*. Environmental Protection Agency, Washington, D.C, Estados Unidos.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA) (2002) *Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms*. US Environmental Protection Agency, Office of Water. Washington, D.C, Estados Unidos.20460, p. 226.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA) (2010) *Toxicological review of hexavalent chromium*. En: Support of Summary Information on the Integrated Risk Information System (IRIS), Washington, Estados Unidos.
- Untersteiner, H.; Kahapka, J. Y Kaiser, H. (2003) *Behavioural response of the cladoceran Daphnia magna to sublethal Copper stress—validation by image analysis*. Aquat.Toxicol. 65: 435-442
- Utz, R.; Hilderbrand, R. y Boward, D. (2009) *Identifying regional differences in threshold responses of aquatic invertebrates to land cover gradients*. Ecological Indicators 9, 556-567.
- Van der Heever, J.A. y Grobbelaar, J.U. (1996) *The use of Selenastrum capricornutum Growth Potential as a Measure of Toxicity of a Few Selected Compounds*. Water S.A. En: *Handbook of chemical risk assessment*. (Eds.: Eisler, R. 2000) Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, Estados Unidos, p. 183-191.
- Vannela, R. y Verma, S.K. (2006) *Co²⁺, Cu²⁺, and Zn²⁺ accumulation by cyanobacterium Spirulina platensis*. Biotechnol. Prog. 22: 1282–1293.
- Vendrell, E.; Ferraz, D.G.B.; Sabater, C. y Carrasco, J.M. (2009) *Effect of glyphosate on growth of four freshwater species of phytoplankton: A microplate bioassay*. Bull Environ. Contam. Toxicol. 82: 538-542.
- Venrick, E.L. (1978) *How many cells to count?* En: *Phytoplankton manual* (Eds.: Sournia, A.) UNESCO, Paris, p. 167-180.

- Vesela, S. y Vijverberg, J. (2007) *Effect of Body Size on Toxicity of Zinc in Neonates of Four Differently Sized Daphnia Species*. Aquatic Ecol. 41: 67.
- Vonviski, K. y Rashlin, J.W. (1991). *The toxic action and interaction of copper and cadmium to the marine algae Dunaliella minuta in both acute and chronic exposures*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 20: 271-275.
- Volesky, B. (2001) *Detoxification of metal-bearing effluents: biosorption for the next century*. Hydrometallurgy. 59: 203–16.
- Volesky, B. (2007) *Biosorption and me*. Water Res. 41: 4017–4029.
- Von Braun, M.; Von Lindern, I.; Khristoforova, N.; Kachur, A.; Yelatyevsky, P.; Elpatyevskaya, V. y Spalinger, S. (2002) *Environmental Lead Contamination in the Rudnaya*. Environ. Res. 88, 164.
- Walter, C.H.; Hopkins, S.P.; Sibley, R.M. y Peakall, D.B. (1997). *Principles of Ecotoxicology*. 2da Eds, Taylor and Francis Ed. Univ. Of Reading UK.
- Wang, J. y Chen, C. (2006) *Biosorption of heavy metals by Saccharomyces cerevisiae: a review*. Biotechnol. Adv. 24: 427–451.
- Wang, J. y Chen, C. (2009) *Biosorbents for heavy metals removal and their future*. Biotechnol. Adv. 27: 195–226.
- Watt. I.M. (1997) *The principles and practice of electron microscopy*. Cambridge University, Cambridge, Inglaterra.
- Watts, E. y Petri, M. (1981). *A scanning electron microscope study of the thoracic appendages of Daphnia magna straus*. Journal of Natural History. 15: 3.
- Weber, J.; Halsall, C. J.; Muir, D. C. G.; Teixeira, C.; Burniston, D.A.; Strachan, W. M. J, et al. (2006) *Endosulfan and γ -HCH in the Arctic: an assessment of surface seawater concentrations and air-surface exchange*. Environ. Sci. Technol. 40:7570–6.
- Weiner, J. A.; DeLorenzo, M.E. y Fulton, M.H. (2004) *Relationship between uptake capacity and differential toxicity of the herbicide atrazine in selected microalgal species*. Aquat. Toxicol. 68, 121-128.
- WHO (World Health Organization). (1984) *Environmental Health Criteria for Endosulfan*. Environmental Health Criteria 40, Geneva. Suiza.
- Wilde, K.L.; Stauber, J.L.; Markich, S.J.; Franklin, N.M. y Brown, P.L. (2006) *The effect of pH on the uptake and toxicity of copper and zinc in a tropical freshwater alga (Chlorella sp.)*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 51, 174–185.
- Winkelmann, D.A. y Klaine S.J. 1991. *Degradation and bound residue formation of four atrazine metabolites deethylatrazine, deisopropylatrazine, and hidroxyatrazine in a western Tennessee Soil*. Environm. Toxicol. Chem. 10: 347-54.
- Winner, R.W. y Farrell, M. P. (1976) *Acute and chronic toxicity of copper to four species of Daphnia*. J. of the Fisheries Resources Board of Canada. 33: 1685.
- Wolff, D. (1904) *Studien uber kutikular und struktur und ihre beziehun zur physiologie der matrix. I Das Ehippium von daphnia pulex*. Biol. Centralbl. 24: 644-650; 697-722; 761-767.
- Wong, C.K. y Pak, A.P. (2004) *Acute and subchronic toxicity of the heavy metals copper, chromium, nickel and zinc, individually and in mixture, to the freshwater copepod Mesocyclops pehpeiensis*. Bull. of Environ. Contamin. and Toxicol. 73: 190-196.
- Woolhouse, H. W. (1981) *Aspects of the carbon and energy requirements of photosynthesis considered in relation to environmental constrains*. En: *Ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters* (Eds.: Solomon, K.R., D.B. Baker, R.P. Richards, K.R. Dixon, S.J. Klaine, T.W. La Point, R.J. Kendall, C.P. Weisskopf, J.M. Giddings, I.I y J.P. Giesy. Environ. Toxicol. Chem.15: 31-76.
- Wright, S. (1938) *A review of the Diaptomus bergi group, with descriptions of two new species*. Transactions of the American Micr. Society 57: 297-315.
- Yan, H. y Pan, G. (2002) *Toxicity and bioaccumulation of copper in three green microalgal species*. Chemosphere. 49: 471-476
- Zoppi de Roa E.; Michelangelli, F y Segovia, L. (1985). *Cladocera (Crustacea, Branchiopoda) de sabanas inundables de Mantecal, estado Apure, Venezuela*. Act Biol. Venez. 12: 43-55.
- Zwack A. (1905). *Der feinere Bau und die Bildung des epiphiums von Daphnia hyaline Leydig*. Z. wiss. Zool. 79:548-573.